

Université de Montréal

Lier la spéciation chimique du cérium à sa biodisponibilité sous différentes conditions environnementales

par

Philippe El-Akl

Faculté des Arts et des Sciences, Département de Chimie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Octobre, 2014

© Philippe El-Akl, 2014

Résumé

L'étude qui suit porte sur l'évaluation du risque écotoxicologique du cérium, l'élément le plus exploité de la famille des lanthanides. La présence grandissante de ce métal dans notre quotidien rend possible son relargage dans l'environnement. Il est donc primordial de comprendre l'impact qu'il aura sur les organismes vivant dans un système aquatique. Une approche centrée sur le modèle du ligand biotique a été utilisée pour évaluer adéquatement l'interaction entre le cérium et un ligand biotique à la surface de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Pour mener une étude sur le risque écotoxicologique d'un élément métallique il faut, avant tout, comprendre la spéciation (répartition sous ses différentes formes chimiques) de l'élément en question. Les premières sections du mémoire vont donc traiter des expériences qui ont été menées pour évaluer la spéciation du cérium dans les conditions expérimentales d'exposition à *C. reinhardtii*. Il sera question de faire la distinction entre la forme particulaire du métal et sa forme dissoute, de caractériser ces changements par spectroscopie ainsi que d'évaluer le pouvoir complexant de la matière organique naturelle. Les résultats montrent une importante déplétion du métal dissout en solution à pH neutre et basique et une forte interaction avec la matière organique naturelle, peu importe le pH de la solution. Ensuite, les expériences de bioaccumulation seront expliquées en comparant l'effet du pH, de la présence d'un ion compétiteur et de la présence de matière organique naturelle sur les paramètres d'internalisation du cérium. Les résultats indiquent qu'à pH acide, le comportement du cérium est plus prévisible qu'à pH neutre. Néanmoins, en tenant compte de la complexité des milieux naturels, l'interaction du métal avec les molécules complexantes va diminuer son risque d'interaction avec un organisme vivant.

Mots clefs : cérium, *Chlamydomonas reinhardtii*, bioaccumulation, spéciation

Abstract

The following study is on the ecotoxicological risk evaluation of cerium, the most widely exploited element of the lanthanide family. The increasing presence of this element in our everyday lives renders possible its release in the environment. It is therefore of primary importance to understand the impact this metal will have on living organisms in aquatic environments. An approach centered on the biotic ligand model was used here to evaluate the interaction between cerium and a biotic ligand at the surface of the unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii*. To study the ecotoxicological risk of a metallic element one must understand the speciation (partitioning between its multiple chemical species) of the element in question. The first chapters of this thesis will discuss the experiments performed to evaluate cerium speciation under exposure conditions *C. reinhardtii*. The issue will be to distinguish between the particulate and dissolved species of the metal, to characterise these changes by spectroscopy, as well as to evaluate the complex formation capacity of the metal with natural organic matter. Results indicate an important depletion of dissolved metal in neutral and alkaline solutions as well as a strong interaction with natural organic matter, regardless of solution pH. Bioaccumulation experiments will then be explained and will compare the effects of pH, the presence of competing ions and the presence of natural organic matter on cerium uptake. Results show that cerium's behaviour is more predictable under acidic pH conditions. Nonetheless, considering the complexity of the natural environment, the interaction of the metal with natural ligands will most likely reduce the risk of cerium's interaction with living organisms.

Keywords: cerium, *Chlamydomonas reinhardtii*, bioaccumulation, speciation

Table des matières

Liste de tableaux	v
Liste de figures.....	vi
Liste des abréviations.....	ix
Liste des sigles	x
Remerciements.....	xi
1. Introduction	1
1.1 Cérium.....	1
1.2 Modèle du ligand biotique (BLM)	10
2. Théorie des méthodes analytiques.....	17
2.1 Fluorescence des lanthanides	17
2.2 Fluorescence de la matière organique naturelle	18
2.3 ICP-MS en mode simple particule	21
3. Expériences préliminaires.....	26
3.1 Adsorption du Ce	26
3.2 Optimisation du SP-ICP-MS.....	27
3.3 Caractérisation de la matière organique	28
4. Publication.....	30
4.1 Abstract	31
4.2 Introduction	32
4.3 Theoretical considerations.....	33
4.4 Experimental section	35
4.5 Results and Discussion.....	39
4.6 Conclusion.....	49
4.7 Acknowledgements	50
4.8 Supplementary information for <i>Linking the chemical speciation of Ce to its bioavailability</i>	51
5. Conclusion	56
6. Bibliographie.....	59

Liste de tableaux

Table I. Nombre de particules de Ce détectées en SP-ICP-MS en fonction de la concentration initiale de métal en solution.	27
Table II. Binding parameters of Suwannee River fulvic acid to Ce determined in pH buffered solutions ($I = 0.01$ M) in the presence of 10^{-5} M of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	43
Table III. Parameters for the biouptake of Cerium by <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> for two different pH values. The star indicates the biouptake parameters at pH 7.0 if point (*) is excluded.	46

Liste de figures

Figure 1. Diagramme de Pourbaix du Ce modifié de Yu et al., 2002 {Yu, 2006 #102}. La concentration en Ce est de 0.01 M en équilibre avec l'atmosphère. Les lignes (a) et (b) définissent la zone de stabilité de l'eau. Les flèches pointillées représentent les changements de spéciation en conditions (c) oxic et (d) anoxique en fonction du pH.....	5
Figure 2. Spéciation des lanthanides entre (a) : leur fraction carbonatée (<5 kDa) et (b) : leur fraction liée à l'acide humique (>5 kDa) suite à une séparation par ultrafiltration [39].	8
Figure 3. Représentation simplifiée du modèle du ligand biotique décrivant la spéciation du métal M et sa possible interaction avec le récepteur cellulaire Rcell.	11
Figure 4. Internalisation de Cd et Pb par <i>C. reinhardtii</i> et <i>C. kesslerii</i> en présence d'une variété de ligands [30]. Les constantes de stabilité sont déterminées à partir de l'équation (5).	12
Figure 5. Flux d'internalisation du Pb chez <i>Chlorella kessleri</i> en fonction de la concentration en ion libre de Pb en solution déterminée par électrode sélective en présence d'acide fulvique (points noirs) et de ligands synthétiques (points blancs) [60].	14
Figure 6. Spectre d'excitation et d'émission du Ce(III) dans l'eau selon Razak, 1998 [71].	17
Figure 7. Courbes hypothétiques d'atténuation de la fluorescence de la matière organique naturelle lors du titrage par un ion métallique [81].....	19
Figure 8. Matrices d'excitation-émission pour l'acide fulvique dans les lacs Toolik et Fryxell [89].	21
Figure 9. Tableau qui différencie le signal obtenue en SP-ICP-MS en fonction de la présence, ou non de particules dans un échantillon [97].	23
Figure 10. Acquisition du signal pour (A) une suspension de particules d'or d'une taille de 150 nm [93] et (B) une solution hétérogène de Ce comprenant du métal dissout et particulaire.	24
Figure 11. Proportion de Ce en solution 8 jours après la préparation des solutions. La concentration initiale en Ce est de 1×10^{-6} M. N=3	26
Figure 12. Matrice d'excitation-émission de la SRFA. La concentration de SRFA est de 5 mg/L.	28

Figure 13. Dissolved (< 3 kDa) cerium measured by centrifugal ultrafiltration. Error bars indicate standard deviations for experiments performed in triplicate. The concentration of cerium was 3.5×10^{-8} M.	39
Figure 14. SP-ICP-MS measurements of Ce solutions at A: pH 5.0 and B: 7.0. Instrument dwell time of 3 ms with 25 000 reads and a Ce concentration of 3.5×10^{-8} M.	40
Figure 15A. Variation of fluorescence intensity at λ_{em} 356 nm for several pH. B. Variation of fluorescence maxima at λ_{ex} 250 nm (full circles) and 260 nm (empty triangles).	42
Figure 16. Fluorescence quenching titration of SRFA by Ce in various pH conditions. The fulvic acid concentration is 1 mg/L and the ionic strength is $I = 0.01$ M. Error bars are for $N = 3$	43
Figure 17. Plots of cerium internalisation fluxes as a function of the concentration of Ce^{3+} at (A) pH 5.0 and (B) pH 7.0. The solid lines represent the Michaelis-Menten plot determined using (A) $K_M = (5.5 \pm 0.3) \times 10^{-8}$ M and $J_{max} = (2.7 \pm 0.7) \times 10^{-14}$ mol cm^{-2} s^{-1} and (B) $K_M = (2 \pm 8) \times 10^{-8}$ M and $J_{max} = (7 \pm 7) \times 10^{-14}$ mol cm^{-2} s^{-1} . In (B), the dashed line represents the Michaelis-Menten plot that is obtained if point (*) is excluded, i.e., $K_M = (1.5 \pm 0.7) \times 10^{-7}$ M and $J_{max} = (8 \pm 2) \times 10^{-14}$ mol cm^{-2} s^{-1} . The maximum diffusion flux of Ce is out of scale.	45
Figure 18. Effect of an increasing calcium concentration on cerium uptake fluxes at pH 5.0 (A) and pH 7.0 (B). The nominal total concentration of Ce was 5×10^{-8} M, corresponding to free ion concentrations of 4×10^{-8} M (pH 5.0) and 6×10^{-9} M (pH 7.0) determined by WHAM 7.0 after correction for particle formation.	48
Figure 19. Effect of fulvic acid on cerium uptake at pH 7. The dashed line represents the predicted biouptake on the basis of the free ion concentration determined using the affinity constant established in the fluorescence quenching titration experiments ($\log K = 5.39 \pm 0.04$) and calculations by WHAM 7.0 software. The error bars on the biouptake experiments are for $N=3$	49
Figure 20. Speciation of cerium as a function of pH, as obtained from the WHAM7 software. The WHAM database was updated using constants from Hayes et al. [127] to take into account $Ce(OH)_2^+$ and $Ce(OH)_3$ species (which were nonetheless negligible). Modelling was performed using a total Ce concentration of 1×10^{-7} M, $T = 20^\circ C$; $pCO_2 = 3.9 \times 10^{-4}$ atm.	52
Figure 21. Particulate Ce measured by SP-ICP-MS using a dwell time of 3 ms and 25000 reads ($n=3$).	53
Figure 22. Excitation-emission matrices for Ce at pH 5.0 and 7.0. The cerium concentration was 5×10^{-5} M at an ionic strength of 0.01 M.	54

Figure 23. Wash efficiency of EDTA after a 1 h exposure of Ce to *Chlamydomonas reinhardtii* at pH 7. N=3. 54

Figure 24. Ce biouptake of *Chlamydomonas reinhardtii* as a function of time at pH 7.0 using a nominal metal concentration of 1×10^{-7} M. Linear regression parameters: $a = 3.7 \times 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ and $b = 7.9 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ 55

Liste des abréviations

BLM : Modèle du Ligand Biotique

ERE : Évaluation du risque écotoxicologique

FA : Acide fulvique

ICP-MS : Plasma Couplé par Induction avec un analyseur en Spectrométrie de Masse

IHSS : Société Internationale des Substances Humiques

MON : Matière Organique Naturelle

REE : Éléments des Terres Rares

SRFA : Acide fulvique de la Rivière Suwannee

SP-ICP-MS : ICP-MS en mode Simple Particule

Liste des sigles

J_{int} = flux d'internalisation du métal à travers le transporteur membranaire ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

J_{max} = flux maximal d'internalisation du métal à travers le transporteur membranaire ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

K_M = constante de Michaelis-Menten (M)

M = métal d'intérêt

K_S = constante conditionnelle d'interaction du métal avec le ligand biotique (M^{-1})

J_D = flux de diffusion du métal en solution à l'état stationnaire ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

D = coefficient de diffusion du métal en solution ($\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$)

c^* = concentration du métal en solution (M)

c^0 = concentration du métal à la membrane cellulaire (M)

δ = largeur de la couche de diffusion à proximité de la surface cellulaire (cm)

r^0 = rayon cellulaire (cm)

K_{Ci} = constante d'interaction d'un ion compétiteur avec le ligand biotique (M^{-1})

C_i = ion compétiteur à l'internalisation du métal d'intérêt

I = fluorescence mesurée (u.a.)

I_{ML} = fluorescence du complexe métal-ligand (u.a.)

C_L = concentration de ligand en solution (M)

C_M = concentration de métal en solution (M)

K = constante d'interaction en le métal et la matière organique naturelle (M^{-1})

λ_{ex} = longueur d'onde d'excitation (nm)

λ_{em} = longueur d'onde d'émission (nm)

Remerciements

Je veux commencer par remercier le professeur Kevin J. Wilkinson pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer mes études graduées sous sa tutelle. Son ouverture et sa patience m'ont permis d'explorer une multitude de facettes de mon projet qui n'ont fait qu'agrandir ma soif d'apprendre et de découvrir.

Le professeur Scott Smith de Wilfrid Laurier University et son équipe ont été très chaleureux lors de ma visite sur leur campus. Professeur Smith était très motivé à m'aider pour les expériences de fluorescence avec la matière organique et son aide fut grandement appréciée.

Ma progression a été facilitée grâce aux multiples conversations enrichissantes avec les membres du groupe et, plus précisément, avec l'aide de Guang Yang, étudiant au doctorat, Madjid Hadioui, Qiao-Guo Tan et Chunmei Zhao, stagiaires postdoctoraux dans l'équipe.

Les hauts et les bas d'un parcours de recherche sont souvent très polarisés et d'avoir partagé les montagnes russes d'émotions avec certains collègues et amis - et eux avec moi - m'a aidé à relativiser et à affronter les situations difficiles une étape à la fois. Merci pour cette aventure : Rita Faid, Martin Dufresne, Philippe Lebel, Julien Breault-Turcot, Stéphanie Poirier, Kim Proulx, Leosveys Diaz, Francis Duquette-Murphy, Élise Morel, Stéphanie Paclot, Jad Zada, Simon Vachon, Olivier Blais-Fréchette, Nicolas Grégoire-Leblanc et j'en oublie sûrement. J'aimerais particulièrement remercier Sébastien Maillette, mon compagnon de conférence, de "workshop" et de dégustation de chocolat, sans qui ce périple n'aurait pas été le même!

Finalement, pour leur support inconditionnel, leur écoute et leurs conseils, je veux remercier ma famille, mon frère et plus particulièrement mes parents sans qui mes accomplissements n'auraient pas eu lieu ou auraient été bien plus difficiles.

1. Introduction

L'exploitation des ressources naturelles du Nord québécois est débattue depuis plusieurs années. Parmi ces ressources, les minéraux ont attiré particulièrement l'attention de compagnies multinationales, ce qui est d'un grand intérêt pour la prospérité économique de la province. Les Terres Rares (REE), famille de 17 éléments métalliques comprenant les lanthanides, le scandium et l'yttrium, sont présents dans les technologies et l'industrie modernes. De nos jours, la grande majorité de l'extraction de ces métaux se fait en Chine. Or, des sources importantes de lanthanides ont été retrouvées dans le Nord Canadien. Malgré le fait qu'aucune exploitation n'est en cours en ce moment, l'utilité des REE a atteint un point tel que leur extraction au Québec est imminente. Ceci soulève le questionnement sur le risque d'un potentiel relargage de ces métaux dans l'environnement. De ce fait, il est important de conduire des évaluations des risques écotoxicologiques (ERE) qui découlent de l'exploitation de ces métaux. Ceci passe par une compréhension des différentes formes chimiques sous lesquelles le métal d'intérêt va se trouver en fonction d'une variété de conditions environnementales (i.e. la spéciation chimique du métal). Par la suite, il est possible d'étudier la biodisponibilité de ce métal, soit son potentiel à intégrer un système biologique. L'objectif global de ce projet est donc d'investiguer le risque écotoxicologique d'un REE, le cérium, en étudiant de façon détaillée les facteurs influençant sa mobilité (transport), sa spéciation (formes chimiques) et sa biodisponibilité vis-à-vis d'un organisme aquatique en laboratoire sous différentes conditions environnementales représentatives des écosystèmes du Québec. Les sections de l'introduction qui suivent vont d'abord éclaircir ce qui est connu vis-à-vis de la biogéochimie du cérium puis discuter de la meilleure manière pour prédire ses effets biologiques dans l'environnement naturel. La théorie derrière le modèle du ligand biotique (BLM) sera abordée afin de fournir un cadre théorique aux études reliant la spéciation chimique à la biodisponibilité de ce métal.

1.1 Cérium

Les éléments de la famille des lanthanides se trouvent à la 6^e période du tableau périodique et vont du La au Lu. Avec Sc et Y, ils forment le groupe des éléments de terres rares («*rare earth elements*») : REE. Les lanthanides ont la particularité d'avoir l'orbitale f peuplée d'électrons

ce qui leur confère des propriétés spécifiques, différentes de celles observées chez les éléments du bloc d. Les REE ont reçu beaucoup d'attention pour leur utilisation dans les hautes technologies. Leur exploitation sert, entre-autre, au développement d'aimants permanents (Nd), de fibres optiques (Er), de la technologie LASER (Nd, Y) et du domaine de l'aérospatial (Sm) pour ne nommer que quelques exemples[1]. L'importance des REE dans les technologies modernes est à un point crucial que le *United States Department of Interior* a écrit un rapport à ce sujet en 2002. Celui-ci concluait en mentionnant le danger que les États-Unis risquent en perdant le contrôle sur l'exploitation et l'expertise sur l'utilisation de ces éléments au détriment de la Chine[2].

Le lanthanide d'intérêt dans cette étude est le cérium. L'utilité du cérium se trouve dans la raffinerie du pétrole, comme catalyseur dans la combustion du carburant automobile, comme agent pyrophorique, etc. Sous sa forme d'oxyde (CeO_2), il est le matériel de choix dans le polissage du verre [1-3]. Le cérium sous sa forme nano-particulaire a même été étudié pour des applications dans le domaine biomédical comme un antioxydant [4], ainsi que comme matériel conducteur lorsque couplé à d'autres éléments [5]. D'autres études investiguent la possibilité d'utiliser cet élément comme absorbant de rayons UV dans les crèmes solaires [6].

Fidèle à sa famille chimique, le cérium est un métal trivalent qui a cependant la particularité de pouvoir passer à un degré d'oxydation (+4). Quelques études thermodynamiques [7, 8] ont démontré que l'oxydation du cérium est négligeable en eaux naturelles, en l'absence d'agents oxydants autres que l'oxygène. C'est le lanthanide le plus abondant sur la planète avec une concentration dans la croûte terrestre d'environ 66.5 mg/kg et dans l'océan d'environ 8.6×10^{-12} M [1]. Il a été déterminé au Japon que la concentration moyenne en cérium dans des eaux naturelles de six rivières se situent en moyenne entre 0.7×10^{-10} et 7×10^{-10} M [9]. Le même ordre de grandeur de concentrations a été retrouvé dans les eaux de la Corée du Sud avec des variations saisonnières qui ont été en partie attribuées à des particules atmosphériques provenant de leurs voisins chinois [10]. Dans le Nord du Québec, une étude évaluant la contribution du Bouclier Canadien en lanthanides aux eaux océaniques a recensé, encore une fois, entre 0.7×10^{-10} et 7×10^{-10} M de cérium dans les eaux de la Baie d'Hudson et de la Grande Rivière de la Baleine [11]. Malgré la présence grandissante du cérium dans la vie quotidienne, peu de recherche a été faite sur les interactions physico-chimiques que ce métal peut avoir

avec les organismes d'un milieu aquatique. Beaucoup d'études se sont attardées sur l'effet aigu des nanoparticules de Ce (nCeO_2), en observant des paramètres vitaux tels que la survie ou la croissance des espèces étudiées [12-18]. L'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* servait d'organisme modèle dans plusieurs de ces études [13-15], démontrant que nCeO_2 inhibait la croissance de l'algue ainsi que son système photosynthétique. Trujillo-Reyes et al. [19] ont démontré l'effet protecteur que l'encapsulation des particules dans de l'acide citrique peut avoir pour *Raphanus sativus*. Zhang et al. [18], quant à eux, ont suivi la transformation des particules de cérium lorsqu'absorbées par *Cucumis sativus*.

Quelques études ont été faites sur les formes dissoutes du cérium. Par exemple, suite à une déficience en calcium, Chao et al. ont démontré que le cérium ionique peut compenser quelque peu à l'inhibition de la croissance de la plante d'épinard [20]. Le même type d'expérience a été conduit par Yuguan et al. avec une déficience en magnésium [21]. Les résultats étaient similaires à ceux en absence de calcium. Ces deux événements ne sont pas les seuls cas où le cérium a démontré un certain effet bénéfique à un système biologique. Des chercheurs ont même démontré l'effet protecteur du cérium contre la dégradation de l'ADN par le cadmium dans les reins chez *Carassius carassius* [22]. Yang et al. [23], quant à eux, ont vu qu'une exposition de 10 à 30 μM de cérium à des cellules de *Armoracia rusticana* améliorait la structure des protéines membranaires, menant à un meilleur échange avec le milieu de croissance des cellules et promouvant ainsi leur croissance. Xia et al. [24] ont démontré que le cérium augmente la perméabilité aux protons et aux ions potassium chez la mitochondrie, ce qui semble en accord avec Yang et al. [23]. En exposant la plante complète de *A. rusticana* au cérium, cependant, Guo et al. [25] ont remarqué que le métal peut se disperser à travers les différents organes suite à une exposition localisée sur une des feuilles de cette dernière. Thomas et al. [26] ont mesuré l'effet du cérium sur trois plantes natives du Canada et deux plantes d'élevage. En regardant la germination et la croissance de ces plantes, les chercheurs ont conclu qu'elles étaient particulièrement sensibles au Ce, surtout en comparant ces résultats à ceux obtenus suite à une exposition au La ou à l'Y. Les auteurs semblaient associer cette sensibilité accrue au cérium à son oxydation de Ce(III) à Ce(IV).

Si l'on regarde les études menées sur d'autres espèces, Wu et al. ont attribué une exposition du cérium à *Drosophila melanogaster* à un stress oxydatif menant à la mort cellulaire par une

perturbation mitochondriale [22]. Ils ont aussi noté l'accumulation de Ce dans le noyau cellulaire menant à un clivage de l'ADN. Chez *Rattus norvegicus*, une ingestion chronique de chlorure de cérium à 20 mg/kg de poids corporel par jour durant 40 jours a eu un effet sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène [27]. Les résultats suggéraient une modification de la structure de la protéine. Chez *Mus musculus*, une injection intragastrique de 20 mg de Ce/kg de masse corporelle pendant 60 jours s'est avérée nocive pour le cerveau. En effet, les auteurs ont constaté l'apoptose des neurones dans l'hippocampe menant à une perte de la reconnaissance spatiale [28].

Les études mentionnées ci-haut se basent principalement sur l'effet biologique d'une exposition au cérium. Les objectifs de recherche visent souvent à observer la croissance, la mortalité ou le comportement d'un organisme quelconque. Les doses du métal sont souvent significativement élevées et peu d'attention est portée aux formes chimiques du cérium dans le milieu expérimental. Un élément dissout en milieu aqueux peut changer d'état d'oxydation et va interagir avec les ligands présents dans la solution. Selon l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), la distribution d'un élément parmi ses différentes espèces chimiques dans un système se nomme sa spéciation [29]. Au cours du 20^e siècle, il a été admis par la communauté scientifique que la spéciation d'un élément métallique influence de façon importante son interaction avec un organisme vivant [30]. Ceci permet de mieux comprendre les mécanismes qui régissent sa toxicité et de prédire son impact sur la faune et la flore. Plus de détails sur le lien étroit entre la spéciation chimique et le potentiel toxique d'un élément seront discutés dans la section de cette introduction qui traite du modèle du ligand biotique. Le reste de ce chapitre va s'attarder sur la spéciation du Ce en eaux naturelles et synthétiques.

Un bon point de départ lorsque vient le temps d'étudier les différentes espèces sous lesquelles va se trouver un métal en solution est de regarder son diagramme de Pourbaix. Aussi nommé diagramme de potentiel/pH, il donne un aperçu global du comportement d'un élément du point de vue de son système électrochimique. Yu et al. [8] ont redéfini le diagramme de Pourbaix du cérium qui se trouve à la figure 1:

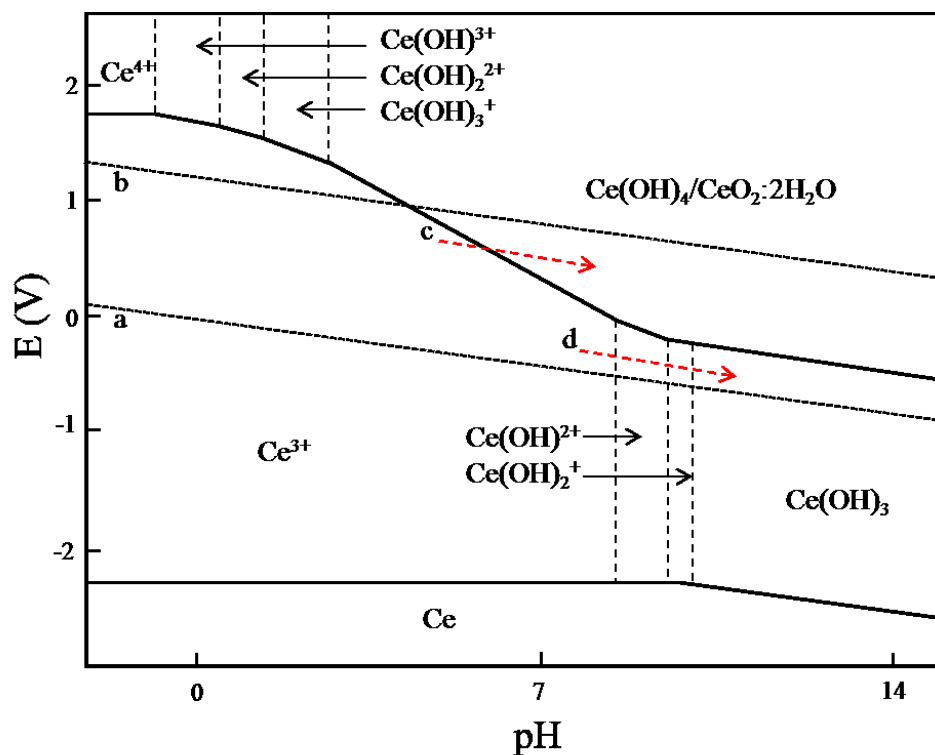
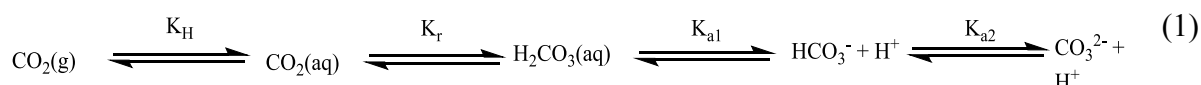


Figure 1. Diagramme de Pourbaix du Ce modifié de Yu et al., 2002 [8]. La concentration en Ce est de 0.01 M en équilibre avec l'atmosphère. Les lignes (a) et (b) définissent la zone de stabilité de l'eau. Les flèches pointillées représentent les changements de spéciation en conditions (c) oxydante et (d) anoxique en fonction du pH.

Selon leurs expériences, lorsque le cérium se trouve en milieu oxydant (limite supérieure dans la zone de stabilité de l'eau) à un pH s'approchant de la neutralité, il devrait s'oxyder et former l'espèce oxyde ou hydroxyde qui sont non solubles. Les auteurs ont, en effet observé un précipité jaune se former un peu en-dessous de pH 6, caractéristique du Ce(IV) solide (flèche (c) dans la figure 1). Lorsque la solution est purgée à l'argon, un nuage ou gel blanchâtre ne se forme qu'autour d'une valeur de pH de 10 (flèche (d) dans la figure 1). Ce précipité est attribué au Ce(OH)_3 . Or, d'autres expériences ont montré qu'advenant le cas d'une oxydation, celle-ci se ferait aux alentours de pH 4.6 et l'espèce finale principale serait le Ce(OH)_4 [7]. Les auteurs concluent cependant, que lorsque le matériel de départ est du Ce(III), c'est des espèces de ce degré d'oxydation qui vont prévaloir en solution.

Outre l'effet du pH et du potentiel oxydo-réducteur du milieu, plusieurs autres ligands entrent en jeu dans l'étude de la spéciation en milieu naturel. Pour commencer, même dans un milieu synthétique considéré comme relativement simple, nul ne peut négliger l'effet du carbone dissout en équilibre avec l'atmosphère. Que ce soit en milieu marin ou en eaux douces, la dissolution du CO₂ atmosphérique ainsi que l'érosion des sédiments mènent à la dissolution de carbonates [31]. Le schéma réactionnel qui suit illustre le phénomène d'équilibre avec l'atmosphère :



La concentration en H₂CO₃ aqueux est généralement négligée lors de cet équilibre. La constante K_{a1} est donc plutôt utilisée pour définir l'équilibre entre le CO₂ aqueux et l'espèce déprotonée HCO₃⁻. La seconde contribution importante en carbonates provient de la calcite :



La réaction de dissociation se produit particulièrement lorsque le pH du milieu diminue et la croissance en ions H⁺ déplace l'équilibre de la séquence réactionnelle (1) vers la gauche. Selon Santé Canada [32], la dureté de l'eau (indicateur de la concentration en carbonates) dans le Nord des Grands Lacs canadiens se situe entre 40 et 80 mg/L. En Ontario en général, les valeurs enregistrées vont même jusqu'à 200 mg/L. Ces concentrations sont représentatives de celles retrouvées dans la plupart des provinces canadiennes. Le carbone inorganique dissout est donc un facteur à prendre en compte lors de la spéciation du cérium.

L'environnement naturel comporte aussi une multitude de molécules organiques. La matière organique naturelle (MON) est définie comme le produit de décomposition d'organismes tels que des plantes ou des microorganismes. Il est possible de distinguer entre deux grandes classes de ces composés [31]: les petites molécules simples et les macromolécules moins bien définies. À part des molécules bien définies comme les acides aminés, les protéines et les polysaccharides, la grande majorité de la matière organique dans les eaux est constituée de molécules hétérogènes et polydisperses (ca 500 Da à 100 kDa) qui s'appellent les substances humiques. Les substances humiques peuvent être répertoriées sous deux sous-classes en

fonction de leur solubilité dans l'eau acide ($\text{pH} < 2$) : l'acide humique et l'acide fulvique. Ces classes de molécules ont des compositions similaires, mais quelques différences distinctes dans leurs propriétés. Par exemple, les acides humiques sont plus hydrophobes (plus aromatiques et plus grands) que les acides fulviques. En s'attardant au rapport C/O, on constate qu'il est plus élevé pour l'acide humique que pour l'acide fulvique. Plusieurs techniques ont permis de recueillir et d'analyser les substances humiques de matrices environnementales. Dans l'environnement, la concentration typique de MON se situe entre 0.1 et 50 mg/L [33]. Elle est impliquée dans plusieurs phénomènes biogéochimiques de grand impact. Par exemple, la complexation de Cu et Hg par la MON a été étudiée par filtration tangentielle et par atténuation de matrices d'excitation-émission de fluorescence [34]. Une nouvelle technique de pseudopolarographie a été développée dans l'étude de la complexation du Pb. [35]. Le développement de techniques analytiques afin de prédire la spéciation d'éléments en présence de MON est un champ de recherche très actif [36, 37].

Les constantes d'interaction du bicarbonate et du carbonate avec les lanthanides ont été évaluées par potentiométrie et comparées aux valeurs obtenues par d'autres techniques [38]. Une des constatations de cette étude est la faible solubilité des espèces carbonatées du La, Ce, Pr et Nd. Si l'on s'attarde au Ce, plusieurs études ont observé ce qui est appelé les "anomalies" du cérium en ce qui a attiré à la tendance que suit la famille des lanthanides (figure 2 [39]). L'étude mentionnée au début de ce paragraphe était faite dans l'acide perchlorique en équilibre avec son sel, un milieu simple [38]. Pourret et al. [39] ont observé une anomalie du Ce dans un milieu riche en carbonates et à pH basique.

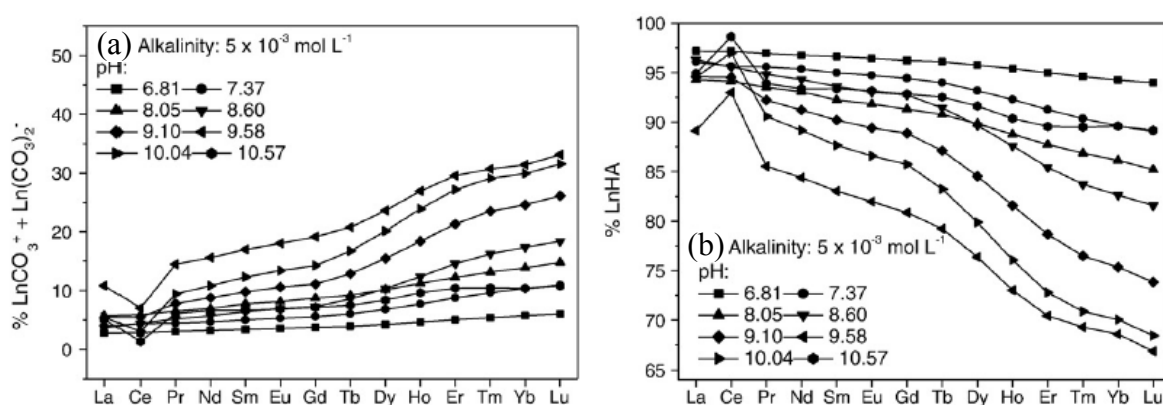


Figure 2. Spéciation des lanthanides entre (a) : leur fraction carbonatée (<5kDa) et (b) : leur fraction liée à l'acide humique (>5kDa) suite à une séparation par ultrafiltration [39].

L'étude se déroulait dans une eau expérimentale comportant de l'acide humique et il a été admis qu'une oxydation du métal facilitée par les carbonates (équation 3 [39]) était suivie par une complexation préférentielle de l'espèce oxydée par la matière organique naturelle (MON). Grâce à cette complexation, il était possible de séparer les espèces du métal par filtration sur des nanopores (les acides humiques, principal composant de la MON ont typiquement une masse molaire de 2000 Da et une taille de 2-3 nm[40]) et de constater un bris dans la tendance des lanthanides au cours de l'expérience (figure 2). Les auteurs comparent ce mécanisme d'oxydation à celui du couple Fe(II)/Fe(III). Il a été rapporté que le potentiel redox du fer diminue en présence de ligands donneurs d'oxygène car le Fe(III) se complexe plus fortement avec ces ligands que le Fe(II) [41]. Ceci favorise l'oxydation du fer vers son espèce trivalente. D'autres évidences de l'oxydation du cérium par le carbone inorganique [42, 43] et par des

espèces telles que l'oxyde de fer [44, 45] ont été rapportées dans la littérature. L'information importante retirée de ces études est que la stabilisation de Ce en eaux douces alcalines par les carbonates et/ou la matière organique naturelle empêche la déplétion du métal de son milieu. À la lumière de ces études, il est évident que la spéciation du cérium n'est pas à prendre à la légère et de se baser sur le comportement de sa famille pour prédire son devenir est une assumption qui peut s'avérer erronée.



Dans le même ordre d'idées, certains groupes se sont penchés sur la récupération du cérium dans un milieu aquatique par des phénomènes d'adsorption. Meisam et al. [46] ont vérifié l'utilité de la pelure de tangerine comme complexant. Ils ont conclu qu'à un pH de 5, l'adsorption du métal sur la poudre de pelure était optimale. Ils n'ont cependant pas mené l'expérience à un pH plus haut que 6, ce qui aurait été intéressant compte tenue de la spéciation complexe du cérium aux valeurs de pH neutres (figure 1). Une autre étude de biosorption a été effectuée avec la feuille de *Pinus brutia* (Pin de Calabre) modifiée à l'acide citrique. Le but de l'étude était de vérifier l'efficacité de la feuille à retirer le cérium d'un milieu aqueux en balayant le pH, la concentration initiale en Ce, la température et le temps de contact[47]. Une complexation optimale a été obtenue à un pH de 6 après 85 min d'exposition, à 20°C et à une concentration initiale de Ce de 6×10^{-4} M. Il est intéressant de constater par ces deux études que le domaine de pH le plus efficace pour travailler avec cet élément demeure en-dessous de la neutralité, laissant sous-entendre la difficulté de prédire le comportement du cérium aux pH neutre et basique. La pelure de tangerine s'avère être plus efficace que la feuille de pin pour retirer le cérium avec 163 mg de Ce / g de pelure de tangerine par rapport à 109 mg de Ce / g de feuille de pin. En 2010, Dubey et al.[48] ont vérifié l'efficacité de l'oxo-hydroxo complexe du fer à retirer le cérium d'un milieu. Il a été conclu qu'à un pH de 8, l'adsorption du cérium était optimale. Le fait que le pH optimal avec le fer est supérieur à celui des complexants organiques mentionnés précédemment est explicable par la stabilité du composé du fer qui est probablement supérieure à pH basique.

Une étude pertinente au projet présent est celle de la complexation par l'acide éthylènediaminetetraacétique (EDTA). Comme il le sera mentionné plus loin, l'EDTA est utilisé dans le protocole de bioaccumulation afin d'arrêter l'internalisation du cérium par *Chlamydomonas reinhardtii*. Du et al. [49] ont observé une forte agrégation de protéines membranaires d'érythrocytes causée par le cérium. Cette agrégation était totalement réversible grâce à l'ajout d'EDTA dans le milieu. La formation d'un complexe de Ce avec l'EDTA a aussi été confirmée par des expériences d'ultrafiltration [50]. Tel qu'attendu, la formation du complexe était plus efficace à pH basique lorsque l'EDTA gagne en charges négatives. Ceci confirme que l'EDTA sera une molécule chélatante de choix lorsque viendra le temps d'arrêter les expériences de biodisponibilité.

1.2 Modèle du ligand biotique (BLM)

Il est bien connu que la complexation des métaux a tendance à diminuer leur biodisponibilité [51-53]. Pour relier le phénomène de la complexation des métaux (ainsi que la multitude de facteurs environnementaux) à leur biodisponibilité chez l'organisme, le modèle du ligand biotique (BLM) a été développé. Le BLM est un modèle thermodynamique qui cherche à évaluer l'interaction possible entre un élément métallique et une membrane cellulaire en considérant que le système étudié est à l'équilibre. Il tente de tenir compte de toutes les interactions possibles d'un soluté avec un ligand biologique sous différentes conditions environnementales [30, 53-56]. Le BLM a été schématisé à la figure 3. On suppose que le métal d'intérêt aura une interaction avec un récepteur cellulaire sensible à ce dernier [30]. La vitesse d'internalisation du métal peut donc être décrite par un flux d'internalisation :

$$J_{\text{int}} = k_{\text{int}} \cdot [\text{R}_{\text{cell}}\text{-M}] \quad (4)$$

où J_{int} est le flux d'internalisation du métal, k_{int} est la constante de vitesse d'internalisation du métal et $[\text{R}_{\text{cell}}\text{-M}]$ est la concentration de l'ion métallique lié au récepteur cellulaire. Pour les fins du modèle, on suppose que l'internalisation est d'ordre 1. Or, modéliser la description du système (métal - ligand biotique) implique plusieurs suppositions:

- a) La membrane cellulaire est le principal site d'interaction pour le métal et est considérée comme étant homogène.

- b) Une liaison 1 :1 est formée entre le métal et le ligand biotique et seulement un composé est transporté à la fois à travers la membrane.
- c) Il n'y a pas de modification, synthèse ou dégradation du ligand biotique.
- d) La diffusion du métal de la solution vers la surface cellulaire n'est pas un facteur limitant à son internalisation.
- e) La formation du complexe entre le ligand biotique et le métal n'est pas un facteur limitant à son internalisation.
- f) La constante de dissociation du métal est équivalente entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.
- g) Les gradients chimiques pouvant se créer entre la surface cellulaire et la solution n'affecte pas l'interaction du métal avec le ligand biotique.
- h) La réponse biologique au métal est directement proportionnelle au flux d'internalisation J_{int} ou à la concentration du métal lié au ligand biotique $[R_{\text{cell}}-M]$

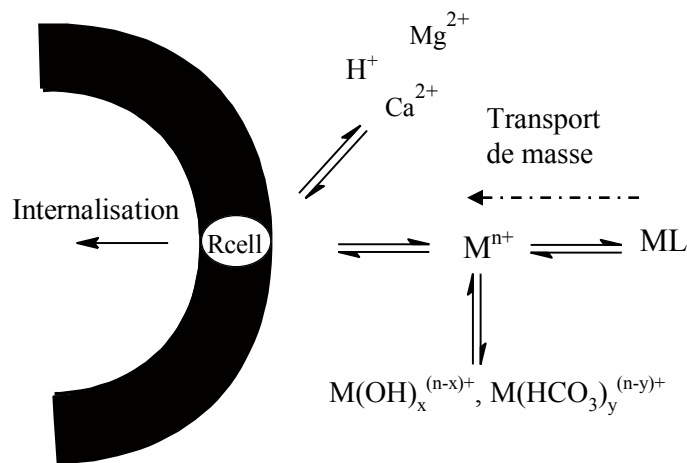


Figure 3. Représentation simplifiée du modèle du ligand biotique décrivant la spéciation du métal M et sa possible interaction avec le récepteur cellulaire Rcell.

Le BLM tient compte du fait que d'autres ions compétiteurs peuvent interagir avec le récepteur et diminuer la concentration du métal d'intérêt à ce récepteur; diminuant ainsi le flux d'internalisation (J_{int}). Il en va de soit pour les complexes que le métal pourrait former en solution, le rendant ainsi non disponible pour se lier au récepteur membranaire. Expérimentalement, l'évaluation de J_{int} est réalisable en surveillant la concentration internalisée du polluant d'intérêt en fonction du temps. En rapportant ces flux mesurés en

fonction des concentrations d'exposition, la tendance observée suit typiquement une cinétique de Michaelis-Menten (figure 4 [30]).

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}}[M^{n+}]}{K_M + [M^{n+}]} \quad (5)$$

Les valeurs pour le flux maximal d'internalisation (J_{max}) et la constante d'interaction à mi-saturation des sites membranaires (K_M) peuvent alors être extraites. En supposant que les conditions mentionnées ci-haut sont respectées et que l'internalisation du composé à travers la membrane est limitant par rapport aux autres flux, il est possible d'évaluer la constante d'affinité de ce dernier au ligand biotique en calculant la réciproque de K_M :

$$K_S = \frac{1}{K_M} \quad (6)$$

La constante conditionnelle d'interaction au ligand biotique, K_S , est ensuite suivie en effectuant l'expérience sous différentes conditions de pertinence environnementale. Plusieurs valeurs de K_S ont été rapportées dans la littérature pour une multitude de métaux et sur une multitude d'organismes (e.g. figure 4).

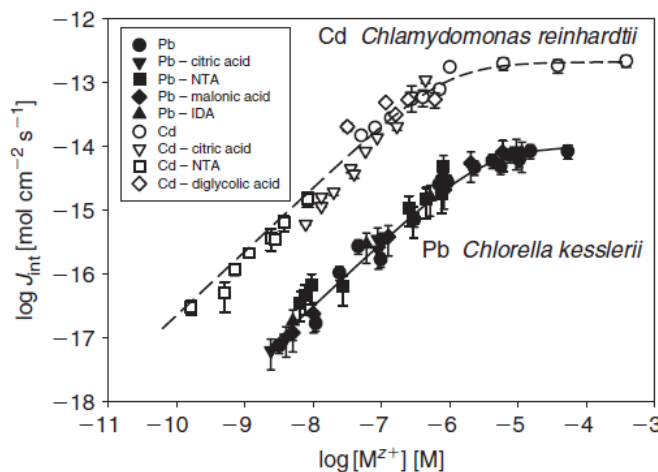


Figure 4. Internalisation de Cd et Pb par *C. reinhardtii* et *C. kesslerii* en présence d'une variété de ligands[30]. Les constantes de stabilité sont déterminées à partir de l'équation (5).

Dans le cas d'une évaluation de la compétition d'un cation au transporteur utilisé par le métal d'intérêt, le mode de compétition qui respecte le point c) des critères mentionnés ci-haut serait

une inhibition compétitive. En tenant compte d'une deuxième constante qui décrit l'interaction du compétiteur avec le récepteur biologique, il devrait être possible de prédire l'effet de deux (ou plusieurs) métaux avec l'organisme (équation 7). Aucun changement ne doit survenir par rapport à J_{\max} , signifiant que le caractère intrinsèque du transporteur face au métal demeure le même et il n'y a ni perte ou gain en nombre de transporteurs à la membrane.

$$J_{\text{int}} = J_{\text{max}} \frac{K_s[M]}{1 + K_s[M] + \sum_i K_{Ci}[C_i]} \quad (7)$$

Où K_{Ci} est la constante d'interaction du métal compétiteur au ligand biotique et $[C_i]$ est la concentration du métal compétiteur en solution.

Plusieurs recherches ont été effectuées sur l'effet de la dureté et du pH (compétition avec Ca, Mg et H) de l'eau sur l'internalisation d'une variété de métaux. Souvent, une diminution des flux d'internalisation est observée avec une diminution du pH dans le milieu d'exposition. Ce comportement est attendu vu la compétition des protons aux pH plus acides. Cette tendance est observée pour une multitude de métaux tels que Ni et Cd [51, 52, 57]. Kola et Wilkinson [51] ont observé l'effet du calcium sur l'internalisation du cadmium dans *Chlamydomonas reinhardtii*. Les flux d'internalisation du Cd étaient 5 fois moins élevés avec le Ca présent en grand excès (1000 fois plus concentré). Ils ont aussi observé l'effet du Zn et du Cu et sont arrivés à la conclusion que le cuivre était un plus grand compétiteur au cadmium que le zinc. François et al. [58] ont aussi vérifié la compétition du calcium au cadmium et ont rapporté une diminution de 40 fois le flux d'internalisation original en présence de 10 000 fois la concentration en calcium. Or cette même expérience n'a diminué le flux d'internalisation du Mn que de 2 fois avec un même excès en Ca. Une diminution du pH a, par le fait même, diminué l'internalisation du Cd par la compétition avec les protons. Notez que d'autres effets de « compétiteurs » ont été vus dans la littérature pour d'autres conditions expérimentales. Par exemple, durant une exposition chronique de 60 h, Lavoie et al. [59] ont conclu que le Zn et le Co à l'état de traces étaient des régulateurs importants de l'internalisation du Cd dans *C. reinhardtii*. Ceci diffère des expériences mentionnées précédemment, conduites sur une période maximale de 1h.

Pour revenir sur l'importance de la spéciation chimique, un autre facteur environnemental qui entre en jeu dans les études d'internalisation est la présence de matière organique naturelle. Selon la théorie derrière le BLM, la fraction de métal complexée par la MON ne devrait pas être disponible pour interagir avec le récepteur membranaire de l'organisme. Dans la littérature, les observations sont souvent plus complexes. Par exemple, pour une même concentration en Pb total, une diminution de l'internalisation de ce dernier a bel et bien été observée chez l'algue *C. kessleri* en présence d'acide fulvique [60]. Cependant, par rapport à la concentration en ion Pb^{2+} , les flux mesurés étaient plus importants (figure 5 [60]), suggérant que les complexes organiques de Pb étaient biodisponibles.

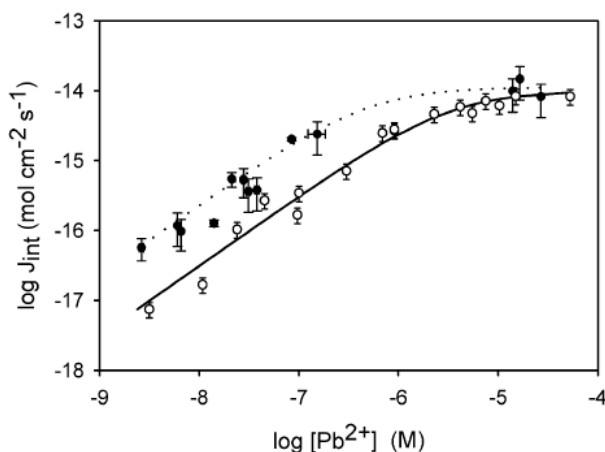


Figure 5. Flux d'internalisation du Pb chez *Chlorella kessleri* en fonction de la concentration en ion libre de Pb en solution déterminée par électrode sélective en présence d'acide fulvique (points noirs) et de ligands synthétiques (points blancs) [60].

Les auteurs ont conclu que la chimie à la surface de l'algue est à prendre en compte lorsque vient le temps d'interpréter l'effet de molécules organiques complexes sur l'internalisation de métaux. Tenir compte de la spéciation en solution est une première étape à compléter et doit s'en suivre une compréhension des mécanismes de sorption à la membrane cellulaire en présence de MON. Campbell et al. [61] ont étudié l'adsorption de substances humiques sur la surface d'organismes unicellulaires et celle-ci semble être plus importante à des valeurs de pH acides. En effet, la protonation de groupements à la fois sur la matière organique et la surface de l'algue permet de réduire les répulsions électrostatiques (aux pH environnementaux, l'algue

et la matière organique sont typiquement chargée négativement). Les substances humiques peuvent alors se rapprocher et interagir de façon plus importante avec la membrane cellulaire. L'étude s'est penchée sur l'effet d'une accumulation de MON à la surface membranaire en évaluant comment cette accumulation influence l'action d'un contaminant sur la membrane. Outre l'impact sur la diffusion d'un contaminant, l'effet de la MON sur la perméabilité de la membrane est à considérer. Parent et al.[62] ont observé que les substances humiques ont permis un rétablissement de la perméabilité membranaire suite à une perte de celle-ci due à la présence d'aluminium. La matière organique aura donc un effet bénéfique à ce niveau. De même, la matière organique en soi peut servir elle-même de source de nutriments (P, N, Fe, etc.) pour les organismes à l'étude. Cette constatation est souvent prise en compte lorsque vient le temps de comprendre certains phénomènes inattendus durant une étude de toxicité [33, 62, 63].

En résumé, la littérature va souvent montrer que l'effet de ligands synthétiques suit bien le modèle du BLM [51, 52, 64] (i.e. la complexation réduit la biodisponibilité des métaux) mais qu'en présence des complexants naturels, comme les substances humiques, il est beaucoup moins clair.

Jusqu'à présent, les études citées étaient conduites sur des métaux divalents. Peu d'études se sont penchées sur les métaux trivalents. L'aluminium est le principal métal trivalent étudié. Une revue de la recherche sur l'aluminium a été effectuée par Gensemer et Playle [65]. En conditions acides, Al a engendré plus de toxicité chez *Asterionella* [66]. Cependant, les auteurs ont mentionné dans leur revue que les résultats dans la littérature semblaient souvent se contredire et présentaient une grande variabilité sur les concentrations jugées toxiques. Ils ont attribué cette dispersion des résultats au fait que plusieurs chercheurs ne considéraient que la concentration total du métal en solution. Une évaluation de la spéciation du métal, selon eux, rapprocherait les concentrations toxiques les unes des autres. Récemment, le scandium a été étudié en se basant sur le modèle d'équilibre du BLM et les résultats montrent une importante compétition des protons au site d'interaction du métal sur la membrane de *C. reinhardtii* [67]. Les auteurs ont conclu qu'il devenait difficile d'utiliser un modèle d'équilibre lorsque le pH passait au-dessus de 6.5. Ils soupçonnent que les complexes hydroxo du métal sont aussi internalisés et il devient alors difficile de prédire la toxicité du métal en se basant sur sa forme

d'ion hydraté. De plus, les auteurs ont tenté d'évaluer son potentiel comme prédictif du mécanisme d'internalisation de l'Al, vu qu'ils possèdent certaines propriétés chimiques similaires. Il s'avère que les deux métaux sont internalisés via deux transporteurs différents avec des affinités différentes pour leur transporteur respectif [68].

Objectifs du projet

À la lumière de l'information résumée dans cette introduction, plusieurs questions se posent quant au potentiel toxique du Ce sous différentes conditions environnementales. Comment est-ce que ce métal se compare aux métaux divalents lorsqu'exposé à un organisme unicellulaire comme *C. reinhardtii*? Est-ce que des ressemblances à l'aluminium et au scandium seront apparentes? Beaucoup d'emphasis a été mise sur la spéciation des métaux et l'implication que ça a pour prédire la toxicité. Est-il possible de confirmer que les logiciels de spéciation prédisent adéquatement la fraction ionique du cérium, un métal dont la chimie est complexe et présente des anomalies par rapport aux autres lanthanides?

Afin de répondre à ces questions, les objectifs de cette étude seront les suivants :

- a) Évaluer la spéciation du cérium en fonction du pH du milieu. La fraction dissoute du cérium sera étudiée par les techniques d'ultrafiltration par centrifugation et de SP-ICP-MS et les efforts seront entamés pour évaluer si l'on peut utiliser l'émission du cérium en fluorescence pour prédire sa spéciation.
- b) Comparer les résultats de spéciation du logiciel d'équilibre WHAM7 aux résultats des expériences de spéciation en a).
- c) Évaluer la constante de stabilité conditionnelle du cérium avec l'acide fulvique dans les conditions expérimentales des milieux d'exposition.
- d) Déterminer les paramètres thermodynamiques d'interaction du cérium avec les sites de transport à la membrane de *Chlamydomonas reinhardtii* et observer les changements qui surviennent à différents pH, à différentes concentrations de Ca et en présence d'acide fulvique.

2. Théorie des méthodes analytiques

Les méthodes de spéciation qui existent actuellement pour les métaux sont des techniques électrochimiques ou qui impliquent une séparation sur une colonne avant l'analyse des espèces en solution[69]. Les techniques électrochimiques impliquent que l'oxygène soit purgé hors de la solution, ce qui est problématique pour évaluer adéquatement la spéciation de ce métal [8]. De plus, il n'existe présentement pas d'électrode sélective au cérium. Notre groupe de recherche travail sur l'utilisation d'une résine échangeuse d'ions pour déterminer la concentration d'ion libre des lanthanides en solution. Comme il n'y a donc pas de méthode analytique disponible pour évaluer la spéciation du cérium, les techniques suivantes ont été utilisées pour suivre le changement de spéciation de ce métal à travers différentes conditions de pH.

2.1 Fluorescence des lanthanides

Les lanthanides sont convoités pour leurs propriétés spectroscopiques intéressantes. L'exemple qui vient en tête est celui de l'euprémium, utilisé pour son émission dans le rouge dans les téléviseurs [70]. Le cérium a, lui aussi, été étudié pour son interaction avec la lumière, que ce soit sous sa forme nanoparticulaire ou ionique [71-76].

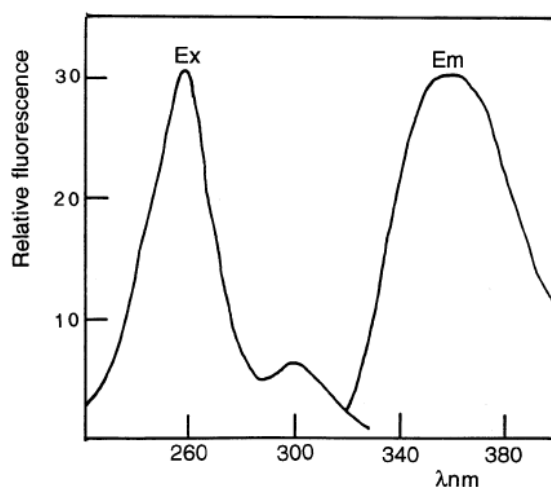


Figure 6. Spectre d'excitation et d'émission du Ce(III) dans l'eau selon Razak, 1998 [71].

Malgré le fait que Razak [71] ne définisse pas exactement à quelle espèce du Ce(III) correspond le spectre à la figure 6, une étude plus approfondie permet de comprendre qu'en

solution aqueuse, la fluorescence à 357 nm vient exclusivement de l'espèce hydratée $[\text{Ce}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$. Le cerium en solution se trouve généralement sous un équilibre entre la forme nona et octahydratée. Cet équilibre est poussé vers la forme octahydratée lorsque le complexe est à l'état excité. Tel que mentionné dans l'introduction, à l'état fondamental le cérium a un électron qui occupe l'orbitale 4f. Par un couplage spin-orbite, cette orbitale subit une levée de dégénérescence et se scinde en les états $^2F_{5/2}$ et $^2F_{7/2}$ [77, 78]. La spectroscopie du Ce est particulière dans le sens que sa transition de plus faible énergie est le passage de son électron de l'orbitale 4f à 5d du métal. Cette transition centrée sur les orbitales métalliques est permise par le spin, les états fondamental et excité étant tous deux des doublets. La relaxation 4f \leftarrow 5d est donc radiative et donne lieu à deux bandes de fluorescences dues au couplage spin-orbite. Ces deux bandes ne sont cependant résolues qu'à faible température.

Les orbitales f sont des orbitales de cœur et ne sont pas vraiment influencées par le milieu dans lequel le métal se trouve. L'orbitale 5d quant à elle s'étend loin autour du noyau et subira des interactions avec les molécules environnantes [77-80]. Un changement dans la spéciation du métal aura une influence sur l'énergie de l'orbitale 5d et donc un déplacement dans les maximas d'excitation et d'émission ou une extinction de l'émission pourraient être observés. Advenant le cas d'un tel changement de la spéciation du cérium en fonction de facteurs environnementaux, il pourrait être possible d'obtenir des données complémentaires sur l'environnement autour du métal. Dans ce cas, il serait possible de mieux interpréter les expériences d'internalisation et de caractérisation d'un point de vue qualitatif.

2.2 Fluorescence de la matière organique naturelle

Il est possible de caractériser la complexation d'un métal par de la matière organique par plusieurs techniques. Une méthode expérimentale rapide et simple pour y arriver est l'atténuation de la fluorescence de la MON. Ryan et Weber ont développé en 1982 une équation permettant de tracer une courbe qui passe par tous les points d'un graphique du titrage de l'acide fulvique par le cuivre [81]. La fluorescence produite par l'acide fulvique durant le titrage est représentée par la somme des ligands fluorescents libres et ceux liés au métal :

$$I = I_L + I_{ML} \quad (8)$$

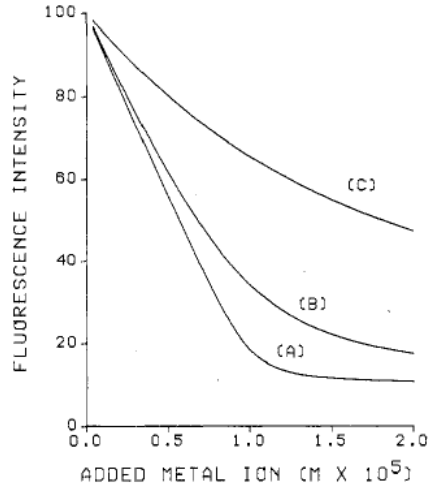


Figure 7. Courbes hypothétiques d'atténuation de la fluorescence de la matière organique naturelle lors du titrage par un ion métallique [81].

Au fur et à mesure que le métal se lie aux ligands, le rendement quantique de fluorescence diminue. Cette diminution linéaire est décrite par l'équation suivante:

$$\frac{[ML]}{C_L} = \frac{I_L - I}{I_L - I_{ML}} \quad (9)$$

Où $[ML]/C_L$ est la fraction des ligands liés au métal exprimée en fonction de l'intensité de fluorescence du système I . I_L et I_{ML} représentent l'intensité de fluorescence des ligands non liés et liés respectivement. En supposant une interaction 1:1 entre le métal et le ligand, l'équation de la constante d'équilibre d'interaction métal-ligand ainsi que les concentrations totales de métal et de ligand peuvent être exprimées comme suit :

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (10)$$

$$C_L = [L] + [ML] \quad (11)$$

$$C_M = [M] + [ML] \quad (12)$$

K est la constante de stabilité du complexe métal-ligand, [ML] est la concentration de complexes en solution, [M] est la concentration de métal non complexé et [L] est la concentration de ligand non complexé. Il est possible d'exprimer la fraction de ligands liés au métal en solution en combinant les équations (9) et (10):

$$\frac{[ML]}{C_L} = \frac{(K[M])}{(K[M] + 1)} \quad (13)$$

En exprimant [ML]/C_L comme étant une seule variable χ_{ML} , il est possible de réécrire l'équation (13) pour inclure la concentration de métal et de complexe en solution :

$$\chi_{ML} = \frac{K(C_M - \chi_{ML}C_L)}{K(C_M - \chi_{ML}C_L) + 1} \quad (14)$$

En transformant l'équation (14) sous forme d'une quadratique, en substituant χ_{ML} pour son équivalent dans l'équation (9) et en normalisant les intensités de fluorescence obtenues par rapport à l'intensité initiale du ligand avant l'ajout de métal i.e. $I_L = 100$, on obtient l'équation finale suivante qui lie l'intensité de fluorescence mesurée I à la concentration de métal totale en solution C_M :

$$I = \left(\frac{I_{ML} - 100}{2KC_L} \right) \left[(KC_L + KC_M + 1) - \sqrt{(KC_L + KC_M + 1)^2 - 4K^2C_LC_M} \right] + 100 \quad (15)$$

En introduisant des valeurs expérimentales de fluorescence en fonction de la concentration en métal titrant dans cette équation, il est possible de tracer la courbe de titrage et extraire les valeurs de K et C_L [81]. Depuis le développement de cette méthode, de nombreuses études ont été effectuées sur une variété de métaux et de contaminants organiques afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'interaction avec les substances humiques [82-86].

Les constantes de stabilité des lanthanides avec la matière organique naturelle ont été évaluées par Sonke et al. [36, 87]. La tendance à travers la famille suit la contraction des lanthanides (diminution du rayon ionique avec le numéro atomique). Une augmentation de la constante de stabilité survient avec une augmentation du numéro atomique à travers la famille. Pour le

cérium, la constante conditionnelle a été évaluée à $K_C = 10.92$ à un $\text{pH} = 7$ et une force ionique de 0.01 M. Les auteurs ont constaté une augmentation de la valeur de la constante avec une augmentation du pH ainsi que lorsque la force ionique du milieu diminue.

Finalement, il est intéressant à noter que plusieurs auteurs ont aussi tenté de caractériser la MON dans une eau naturelle par spectroscopie, grâce à des matrices d'excitation-émission [88-93]. Par exemple, Leenheer et Croue [33] ont fait la distinction entre deux grandes classes de fluorophores en milieux aquatiques environnementaux : ceux de nature humique avec une excitation entre 250-350 et une émission entre 380-480 et ceux de nature protéique avec une excitation entre 270-280 et une émission entre 300-350 (pics associés aux acides aminés tyrosine et tryptophane). La figure 6 montre une matrice typique d'excitation-émission pour l'acide fulvique dans deux lacs différents. Le lac Fryxell qui se trouve en Antarctique et le lac Toolik en Alaska [92].

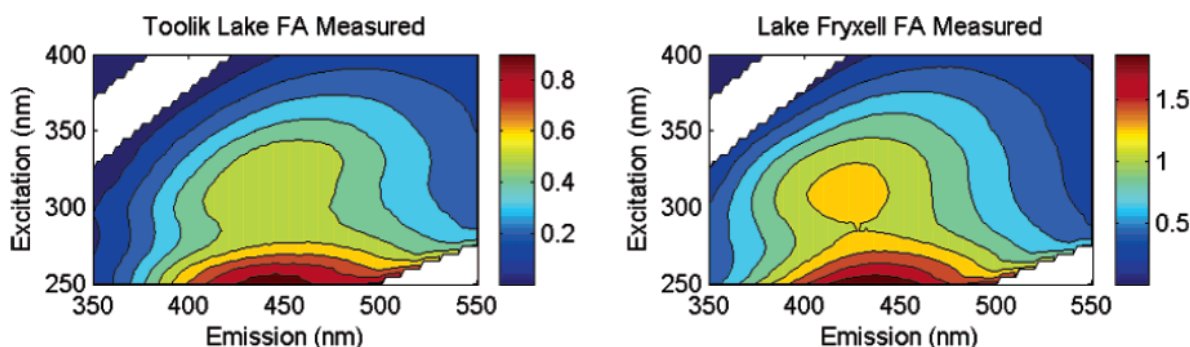


Figure 8. Matrices d'excitation-émission pour l'acide fulvique dans les lacs Toolik et Fryxell [92].

2.3 ICP-MS en mode simple particule

L'utilisation de l'ICP-MS en mode simple particule a commencé au début des années 2000 pour la détection de colloïdes naturels [94-96]. Cette technique prometteuse permet de détecter et quantifier des particules à de très faibles concentrations, représentatives d'un milieu environnemental. Des efforts ont été mis dans les dernières années afin d'optimiser cette technique pour qu'un jour elle soit une référence en termes d'analyses de la taille, de la concentration et de la stabilité de nanomatériaux [97-99].

L'ICP-MS mesure un nombre de comptes par seconde (cps) de l'analyte d'intérêt dans un échantillon. Ce nombre de comptes représente l'intensité du signal analytique i qui est directement proportionnelle à la concentration massique de l'analyte, m_c en mg/L. Dans le cas d'une particule, la concentration massique est reliée à la concentration en nombre de particules, N_c , selon l'équation :

$$m_c = N_c \rho \Sigma_i V_{pi} \quad (16)$$

Où ρ est la densité d'une particule en g/cm³ et V_{pi} est le volume d'une particule en cm³. D'un point de vue instrumental, il faut considérer la fréquence à laquelle une particule va atteindre le plasma selon :

$$F_p = N_{eff} S_{flow} N_c \quad (17)$$

La fréquence F_p dépend de la concentration particulaire en nombre, N_c , de l'efficacité de nébulisation, N_{eff} et du débit de l'échantillon, S_{flow} . Dans le même ordre d'idées, la fréquence à laquelle une particule va atteindre le détecteur est évaluée selon :

$$F_d = A_{eff} i_{eff} T_{eff} F_p \quad (18)$$

Avec A_{eff} et i_{eff} qui représentent l'efficacité d'atomisation et d'ionisation de l'élément dans le plasma et T_{eff} qui représente l'efficacité de transmission de l'élément du plasma au détecteur. En supposant que l'efficacité d'atomisation, d'ionisation et de transmission d'une particule est similaire à celle de son élément à l'état monoatomique [100], il est possible d'étalonner l'instrument en utilisant l'analyte sous sa forme ionique.

La figure 9 illustre le signal enregistré lorsqu'un flux continu d'ions (haut) et lorsqu'une solution de nanoparticules parfaitement stable (bas) sont acheminés au détecteur de l'instrument. Comme il est possible de le constater, un flux continu d'ions permet d'enregistrer un signal continu et stable par le détecteur. Peu importe à quel moment le détecteur sera ouvert, le signal demeurera constant avec un très faible écart d'un enregistrement à l'autre. Dans le cas d'une suspension de particules avec peu ou pas d'ions métalliques en solution, le signal enregistré la majorité du temps sera faible et une fois de temps en temps une impulsion intense va apparaître. Cette impulsion correspond au passage

d'une particule à travers le plasma générant une multitude d'ions qui seront acheminés en même temps vers le détecteur.

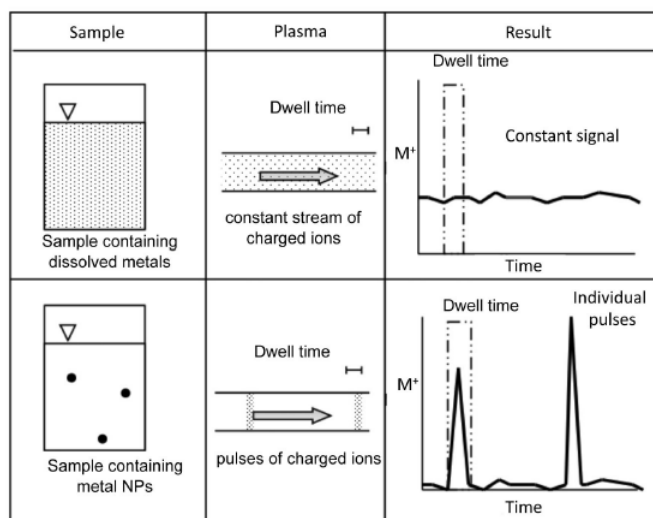


Figure 9. Tableau qui différencie le signal obtenue en SP-ICP-MS en fonction de la présence, ou non de particules dans un échantillon [97].

Plusieurs éléments sont à prendre en compte lorsque vient le temps de préparer un échantillon et une méthode pour l'analyse en mode SP-ICP-MS:

- i. Le temps de lecture (*dwell time*) représente le temps durant lequel le détecteur est ouvert et acquiert un signal. Ce temps est optimisé afin que le détecteur ne perçoive qu'une particule à la fois. Il s'agit donc d'avoir un temps de lecture assez court pour ne pas lire plusieurs particules en même temps, mais assez long pour ne pas lire une particule plusieurs fois. Ce temps peut être ajusté en fonction de la taille de la particule analysée. Lorsque l'instrument est opéré en mode normal, le temps de lecture moyen est de 50 ms. En mode simple particule, ce temps est réduit à 1 ms et, par exemple, il est possible de caractériser des nanoparticules d'argent allant de 20 à 100 nm [101].
- ii. Afin de simplifier le choix du temps de lecture, la concentration de l'échantillon analysé doit être suffisamment faible pour éviter l'arrivée de deux particules au détecteur en même temps.

- iii. Le temps de repos est le temps durant lequel le détecteur est éteint entre les lectures. Ce temps doit être court afin de détecter la totalité des particules aspirées durant l'analyse. Par le fait même, un nombre élevé de lectures (20 000 et plus) combinée à un court temps de repos permet d'assurer une analyse représentative de l'échantillon.

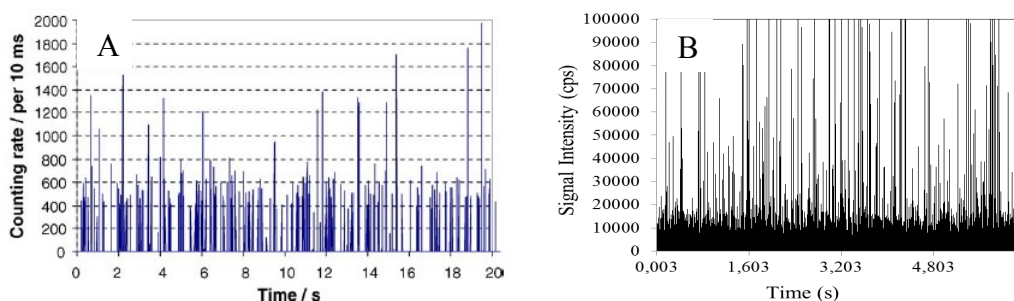


Figure 10. Acquisition du signal pour (A) une suspension de particules d'or d'une taille de 150 nm [96] et (B) une solution hétérogène de Ce comprenant du métal dissout et particulaire.

La figure 10 montre une autre complication dont il faut tenir compte lors d'une analyse SP-ICP-MS d'une solution dans laquelle l'élément se trouve sous différentes formes. Il devient rapidement difficile de ségréguer la forme ionique de la forme particulaire du métal en analysant le graphique (B) de la figure. Travailler dans un milieu dilué permet de diminuer le signal attribué au métal monoatomique et ainsi mieux détecter et compter les particules par traitement informatique. Afin de déterminer le seuil à partir duquel les comptes sont attribuables aux particules, la moyenne des comptes attribués à la fraction dissoute est déterminée et un facteur permettant d'éliminer tous les signaux qui sont associés au métal monoatomique y est ajouté. Typiquement, une bonne approximation du seuil est obtenu en ajoutant un facteur qui correspond à 3 à 5 fois de l'écart-type de la valeur du dissous. Par la suite, par itération, le processus est répété jusqu'à ce que tous les comptes utilisés dans le traitement de données soient associés au métal sous sa forme particulaire [101]. Dernièrement, différentes solutions ont été proposées pour réduire ce bruit comme, par exemple, l'utilisation d'une résine cationique avant l'injection de l'échantillon dans l'instrument [101]. La résine retient le métal chargé monoatomique et laisse passer les espèces neutres particulaires.

Compte tenu des particularités de la spéciation du cérium mentionnées dans le chapitre 1, l'ICP-MS en mode simple particule serait une technique de choix pour détecter la formation d'espèces non solubles nanoparticulaires.

3. Expériences préliminaires

Plusieurs expériences préliminaires ont été conduites avant les expériences principales qui se trouvent dans la publication. Ces expériences ont permis d'optimiser les protocoles utilisés et ont été une source d'inspiration pour l'élaboration d'expériences plus complètes. Cette section décrit ces expériences.

3.1 Adsorption du Ce

Il est souvent question dans la littérature de la faible solubilité du cérium résultant d'un changement de spéciation avec le pH [7, 8, 50]. Afin de vérifier l'importance du phénomène de précipitation du cérium, un premier test a été effectué au cours duquel 6 solutions de $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ à 1×10^{-6} M ont été préparées aux pH suivants : 5.0 ± 0.4 , 6.0 ± 0.3 , 6.9 ± 0.1 , 8.0 ± 0.1 et 9.2 ± 0.3 en triplicata. Les solutions étaient laissées au repos pendant 8 jours et par la suite 5 mL ont été prélevés et acidifiés avec 100 μL de HNO_3 70% ultrapure pour l'analyse à l'ICP-MS. Un volume de 5 mL de chaque solution a aussi été prélevé au moment de leur préparation pour analyser la concentration initiale en métal. Avant les deux prélèvements, les solutions ont été agitées pour les homogénéiser.

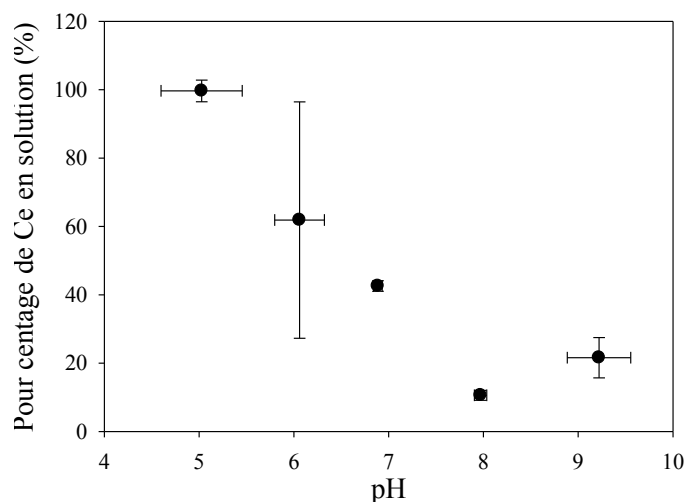


Figure 11. Proportion de Ce en solution 8 jours après la préparation des solutions. La concentration initiale en Ce est de 1×10^{-6} M. N=3

Les résultats à la figure 11 montrent une déplétion de la concentration de métal en solution probablement par adsorption sur les parois du tube en polypropylène. Cette déplétion de la concentration de métal en solution mène à un questionnement sur les autres espèces qui se forment avec l'augmentation du pH. Ceci a motivé l'investigation sur la spéciation du cérium entre sa forme particulaire et dissoute, ce qui a mené aux expériences d'ultrafiltration et l'utilisation de l'ICP-MS en mode simple particule.

3.2 Optimisation du SP-ICP-MS

Tel que mentionné dans la chapitre 2, la concentration à laquelle les analyses de SP-ICP-MS sont faites est importante afin de pouvoir détecter les signaux générés par les particules de métal. Idéalement, il faut effectuer les expériences à la même concentration qu'en ultrafiltration afin de pouvoir comparer le mieux possible les résultats des deux méthodes. En ultrafiltration, les expériences menées en-dessous de $3.6 \times 10^{-8} \text{ M}$ au pH 7 et 8 étaient sans succès. Il fallait donc s'assurer qu'à $3.6 \times 10^{-8} \text{ M}$ - concentration limite à laquelle les expériences d'ultrafiltration étaient concluantes - le signal de particules en SP-ICP-MS était bien détectable. Pour ce faire, trois solutions de $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ à des concentrations de 0.07×10^{-8} , 0.7×10^{-8} et $3.6 \times 10^{-8} \text{ M}$ à un pH de 8.0 ont été analysées en SP-ICP-MS 24h après leur préparation. L'instrument a effectué 20 000 lectures par échantillon avec un temps de lecture de 3 ms. Chaque échantillon a été analysé en triplicata.

Table I. Nombre de particules de Ce détectées en SP-ICP-MS en fonction de la concentration initiale de métal en solution.

Concentration en Ce (M)	Nombre de particules (particules/L)
0.07×10^{-8}	$(6.8 \pm 0.9) \times 10^6$
0.7×10^{-8}	$(4 \pm 4) \times 10^6$
3.6×10^{-8}	$(4.6 \pm 0.7) \times 10^6$

Tel que montré dans le tableau I, il est possible de constater qu'entre les deux plus hautes concentrations en métal il n'y a pas de différence significative du nombre de particules détectées par l'instrument.

Statistiquement (test t-Student), à 0.07×10^{-8} M il y a un plus grand nombre de particules détectables par rapport à 3.6×10^{-8} M avec 95% de certitude. Le signal enregistré à 3.6×10^{-8} M est néanmoins acceptable. Il est donc raisonnable d'effectuer les expériences conjointes avec l'ultrafiltration à une concentration de 3.6×10^{-8} M.

3.3 Caractérisation de la matière organique

Afin de vérifier la fluorescence de la matière organique naturelle, une matrice d'excitation-émission a été tracée avec de l'acide fulvique de la Rivière Suwannee (*Suwannee River Fulvic Acid*, SRFA) de la Société Internationale des Substance Humiques (IHSS). Une solution de 5 mg/L de SRFA a été préparée dans de l'eau Milli-Q et la fluorescence a été mesurée grâce à un spectrophotomètre Cary Eclipse de Varian en balayant les longueurs d'onde d'excitation (λ_{ex}) de 200 à 450 nm et en mesurant l'émission entre (λ_{em}) 250 et 600 nm.

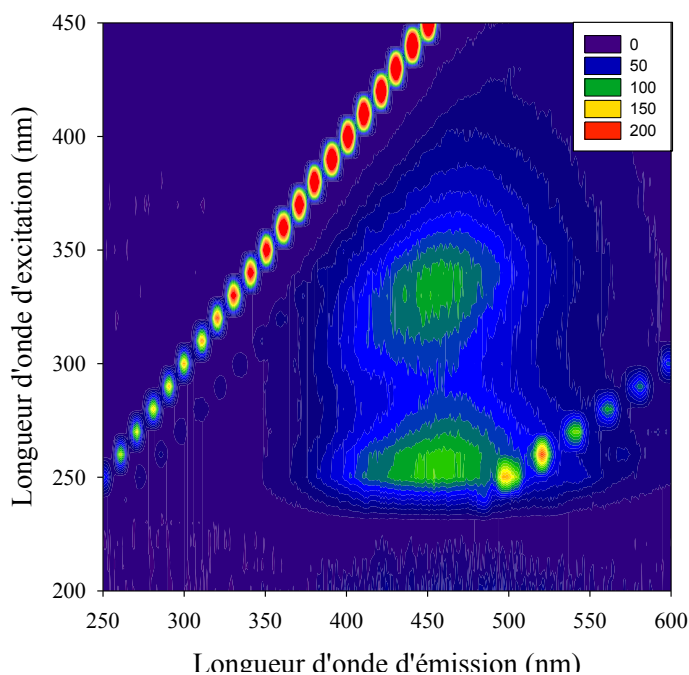


Figure 12. Matrice d'excitation-émission de la SRFA. La concentration de SRFA est de 5 mg/L.

Selon la figure 12, un maxima d'excitation (λ_{ex}) de 325 nm et un maximum d'émission (λ_{em}) de 450 nm a été choisi pour les expériences de fluorescence par la suite. Les expériences de

titrage de la SRFA par le Ce sont désormais effectuées à ces maxima de fluorescence. Les expériences décrites ci-haut ont servi de point de départ à l'élaboration d'expériences plus complètes. Elles ont aussi permis d'établir les conditions sous lesquelles certains projets ont été menés et ont ouvert la porte à des idées pour des expériences futures.

4. Publication

Linking the chemical speciation of Ce to its bioavailability

Philippe El-Akl[†], Scott Smith[‡], Kevin J. Wilkinson^{†*}

[†]Biophysical Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal H3C 3J7, Canada

[‡]Department of Chemistry, Wilfrid Laurier University 75 University Avenue West, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3C5

*Corresponding author: Phone: +1-514 3436741; fax: +1-514 343 7586

Submitted to : *Environmental Toxicology and Chemistry*

4.1 Abstract

Over the past decade, researchers have started to use metals of the lanthanide family for numerous applications, including liquid crystal display (LCD) screens, optical fibers and LASER technology. Unfortunately, we presently know very little about their bioavailability, nor the mechanisms by which they might cause toxicity. This paper focuses on cerium, which is one of the most widely used lanthanides, and focuses on validating the biotic ligand model as a means to predict Ce bioaccumulation. Short term exposures to Ce were performed using the unicellular alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, in order to better relate Ce bioavailability to its chemical speciation in solution. Maximum uptake fluxes (J_{\max}) and affinity constants for the binding of cerium to the biological uptake sites (K_S) were established at pH 5 and pH 7. An apparent affinity constant of $1.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ was observed at pH 5, with a larger value obtained at pH 7 ($6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), albeit under conditions where equilibrium could not be confirmed. By evaluating cerium speciation using centrifugal ultrafiltration and single particle inductively coupled plasma spectrometry, it could be concluded that little (~30%) cerium appeared to be truly dissolved at pH 7.0, with the majority of the metal being removed by ultrafiltration. Speciation was also monitored using fluorescence techniques to evaluate complexation by natural organic matter (NOM). The presence of NOM increased complexation and decreased Ce bioaccumulation. Finally, competition with calcium for metal uptake sites was also taken into account. In agreement with the BLM, the presence of calcium resulted in a decrease in cerium uptake by *C. reinhardtii*.

Keywords: cerium, bioaccumulation, *Chlamydomonas reinhardtii*, speciation, spectroscopy.

4.2 Introduction

It is now widely accepted that the chemical speciation of metals is key to understanding their potential toxic effects on living organisms [30, 53]. Thermodynamic models, such as the biotic ligand model (BLM) and the free ion activity model (FIAM), have been developed in order to predict the biological fate of metals. Indeed, the interaction of several divalent metals (e.g. Cu, Zn, Pb, Ni and Cd) with a number of model organisms is now fairly well understood for a number of environmental conditions (e.g. [58, 102-105]). On the other hand, a number of emerging metals are considered to be “data-poor”, when it comes to understanding their geochemical mobility, chemical speciation, bioavailability and toxicity. For example, high tech industries, such as those preparing hybrid batteries or computer touch screens rely on metals that are among the rare earth elements (REE) of the periodic table. Among the REE, cerium(III) is used as a catalyst for reducing diesel/biodiesel soot emissions [3] and as a catalyzer in self-cleansing ovens [1]. In its oxidized state, CeO_2 is a commonly used glass polisher [2]. While a few toxicity assays have been carried out on Ce [27, 28, 106], little work has been undertaken to understand the role that chemical speciation plays on its bioavailability.

The (generally trivalent) lanthanides are poorly soluble in the natural environment. This is an especially important point for cerium, which has the potential to oxidize from Ce(III) to Ce(IV), especially when the pH is increased to circumneutral values[8]. In addition to insoluble cerium oxides (CeO_2) or hydroxides (Ce(OH)_3 , Ce(OH)_4) that can form in aqueous media, there is also an emerging consensus that other, ill-defined compounds may be present under conditions of circumneutral pH [7, 39, 50]. Unfortunately, no analytical techniques are currently available to specifically measure the chemical speciation of cerium under environmental conditions of low concentration and multiple ligands. While chemical equilibrium models, such as WHAM [107], can predict the partitioning of the Ce(III) species, they must be at thermodynamic equilibrium, which is not the case if metastable species are present.

The BLM has proven to be a useful construct for predicting the bioavailability of metals in aqueous media [30, 53, 56]. In order to apply the BLM, conditional stability constants that describe the interaction of the metal with a given biotic ligand are required. Metal biouptake is

one of the endpoints that can be used to determine stability constants, in which case, the constant describes the interaction of the metal with metal transport sites in the biological membrane. In the majority of studies, complexation with ligands and competition with other metals have been shown to reduce the biological effects of metals [52, 60, 108, 109] by reducing the magnitude of interaction of the free ion with the biological organism. For example, metal toxicity and biouptake are generally reduced in the presence of natural organic matter (NOM), although the reduction is not always in line with the decrease in concentration of the free ion [60-62].

In this study, centrifugal ultrafiltration and inductively coupled plasma-mass spectrometry in its single particle mode (SP-ICP-MS) [94, 99-101] were used to quantify the dissolved Ce under a number of environmentally relevant conditions. Fluorescence measurements were performed to further quantify changes in metal speciation with pH and the presence of natural organic matter. Finally, biouptake fluxes were measured for *Chlamydomonas reinhardtii* in order to quantify the metal's interaction with biological uptake sites and to verify whether the BLM would be a useful construct for predicting Ce bioavailability.

4.3 Theoretical considerations

Bioaccumulation experiments

Parameters describing metal biouptake can be obtained from the Michaelis-Menten equation:

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}}[M^{z+}]}{K_M + [M^{z+}]} \quad (19)$$

where J_{int} is the metal internalization flux, J_{max} is the maximum internalization flux and K_M is the Michaelis-Menten (dissociation) constant. It should be noted that most models of metal biouptake and toxicity (e.g. BLM, FIAM) consider only the interaction of the free (non-complexed) metal (M^{z+}) with the sensitive sites on the biological receptor. By plotting metal uptake fluxes against the free ion concentration in solution, it is possible to extract the conditional stability constant of the metal to the membrane transport site:



since under equilibrium conditions, K_S is simply the reciprocal of the Michaelis-Menten constant, $1/K_M$. Equilibrium conditions are generally assumed to occur when metal internalization fluxes are rate-limiting. This point can be experimentally verified by comparing the calculated maximal diffusive flux of the free ion:

$$J_D = D(c^* - c^0) \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r^0} \right) \quad (21)$$

with the measured internalization fluxes. In this case, J_D ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) is the steady-state diffusive flux of Ce^{3+} , D is the diffusion coefficient for Ce^{3+} ($6.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, [110]), c^* (M) is Ce^{3+} concentration in bulk solution, c^0 (M) is Ce^{3+} concentration on cell membrane (assumed to be 0), δ is the diffusion boundary layer thickness (8×10^{-6} m, [111]), r^0 is the cell radius (3.5×10^{-6} m, measured by the Coulter Multisizer 3).

Finally, the effect of other cations on the Ce uptake flux can be accounted for by modifying the Michaelis-Menten equation:

$$J_{\text{int}} = J_{\text{max}} \frac{K_S[M]}{1 + K_S[M] + \sum_i K_{Ci}[C_i]} \quad (22)$$

where K_{Ci} is a constant describing the interaction of the competing cation (C_i) for biological uptake sites.

Fluorescence quenching titration

Fluorescence quenching titration curves can be modeled according to the Ryan and Weber equation [81]:

$$I = \left(\frac{I_{\text{ML}} - 100}{2KC_L} \right) \left[(KC_L + KC_M + 1) - \sqrt{(KC_L + KC_M + 1)^2 - 4K^2 C_L C_M} \right] + 100 \quad (23)$$

where I is the measured fluorescence, I_{ML} is the fluorescence of the metal-ligand complex relative to the fluorescence intensity of the free ligand, C_L (M) is the ligand concentration in solution, C_M (M) is the metal concentration in solution and K is the binding constant of the metal to the ligand. Under the assumption of a 1:1 binding between the metal and the ligand, K and C_L can be evaluated by titrating the fluorescent ligand (i.e. humic substances) with the metal of interest (i.e. Ce).

4.4 Experimental section

Experimental media. All Ce solutions were prepared from a 1000 mg L⁻¹ stock solution of Ce(NO₃)₃ in 7% HNO₃ (Inorganic Ventures). Stock solutions with lower concentrations were kept in 2% ultrapure nitric acid (BDH) in Milli-Q water (R>18 MΩ cm; dissolved organic carbon<2 µg C L⁻¹). Biouptake and speciation measurements were performed in pH controlled media composed of 0.01 M NaNO₃ (Sigma) for pH 4.0, 0.01 M NaMES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic sodium salt, Acros Organics) for pH 5 and 6 and 0.01 M NaHEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic sodium salt, Fisher bioreagents) for pH 7 and 8. All media contained 1x10⁻⁵ M of Ca(NO₃)₂ (Sigma Aldrich) in order to help preserve the integrity of the biological cell wall [112]. Following their preparation, solutions were placed on a rotary shaker (100 rpm) for 24h. For experiments involving natural organic matter, a Suwannee River fulvic acid standard (SRFA, 2S101F) was used. Stock solutions of 250 mg L⁻¹ of SRFA were prepared by dissolving the lyophilized solid in the experimental media described above at pH 5.0, 6.0 or 7.0. Following a 24 hour equilibration, stock solutions were then diluted into buffered experimental media for use after a further 24 h. All polymerware were soaked a minimum of 24 hours in 2% HNO₃ then rinsed 7x with MilliQ grade water, before drying under laminar flow.

Speciation experiments

ICP-MS in single particle mode. SP-ICP-MS experiments were performed using 3.5x10⁻⁸ M Ce in the experimental media defined above. Solutions were analyzed using a PerkinElmer NexION 300x inductively coupled plasma/mass spectrometer (ICP-MS) functioning in single particle mode [101] (instrument dwell time = 3 ms, 25000 reads). All solutions were analyzed in triplicate.

Ultrafiltration. Dissolved Ce was separated by centrifugal ultrafiltration (3 kDa molar mass cut-off Amicon filters), which filtered 4 mL of sample. Centrifugation tubes were rinsed once with a 2% HNO₃ washing solution (Fisher chemicals) and once with Milli-Q grade water, prior to use. Filters were pre-conditioned with 1x10⁻⁵ M lanthanum (Inorganic Ventures) prepared in the experimental media. After adding the preconditioning solutions, tubes were centrifuged for 30 min. at 4000 rpm (3345xg) in a Multifuge s-r Heraeus centrifuge. Filters were rinsed 2x with the exposure medium. Conditioned filters and acid washed centrifugal tubes were dried under laminar flow, prior to use. Experimental solutions containing 3.5x10⁻⁸ M Ce were ultrafiltered at 4000 rpm (3345xg) for 45 minutes. Less than 100 µL of solution remained above the filter after centrifugation. The filtrate was acidified with HNO₃ (final concentration 2%) prior to analysis by ICP-MS.

Cerium fluorescence. Solutions containing 5 x 10⁻⁵ M Ce were prepared across the pH range of 4.0-8.0 in 50 mL tubes (Corning) in the same media as described above. Solutions were equilibrated 24-48 h using rotary shaking prior to analysis. Fluorescence was measured on a Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer by performing excitation-emission matrices. Excitation wavelengths were swept from 230 to 270 nm (5 nm increment) whereas emission was measured between 300 and 430 nm.

Fulvic acid titration. Conditional binding constants for complexes between cerium and the Suwannee River fulvic acid (SRFA) were evaluated by fluorescence quenching titrations ([81]). One mg L⁻¹ SRFA solutions were prepared from the SRFA stock solutions. Ce ranging from 5x10⁻⁷ M to 4x10⁻⁵ M was added to the solutions and pH was adjusted with high purity HNO₃ (BDH) or NaOH (Sigma). Solutions were equilibrated on a rotary shaker for 24 to 48 h prior to analysis. Fluorescence was measured on triplicate samples using a Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer at an excitation wavelength of 325 nm and a emission wavelength of 450 nm [92]. Interference by Ce fluorescence was not a problem at these wavelengths. Statistical analysis of the fittings was performed using a Monte Carlo method. After the initial model fit was determined a random one third of the data points were replaced with the model fit and random error corresponding to measured sample variance was added to each simulated data point. This new data set was fit and the best-fit parameters

recorded. The process was repeated 1000 times. Confidence intervals about parameter estimates are determined based on the 1000 replicate determined values for the parameters.

Bioavailability experiments

Algal growth. A wild type CL2010 strain of *Chlamydomonas reinhardtii* was used in all experiments. This alga has the advantage of having often been employed for metal bioavailability determinations [51, 52, 57, 58, 63, 67, 106, 113, 114] and of having a completely sequenced genome [115]. Algal cultures were maintained in 1.5% agar gel containing tris-acetate-phosphate (TAP) medium [116]. A fresh agar petri dish was inoculated every two weeks. Algae were transferred into 100 mL of a diluted (4x) liquid TAP medium (pH 7.0) in order to initiate algal growth at 20°C in a 12/12h light/dark incubator (Infors HT, Multitron) using 100 rpm of orbital shaking with fluorescence lighting (75 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) [51]. At mid-log exponential growth rate ($1.5\text{-}3 \times 10^6$ cells/mL), the algae were diluted into 500 mL of TAP medium. Three more days of incubation were then required to reach mid-log exponential growth in this second sub-culture. Cell densities were measured on a diluted cell culture (100x in Isotone II, VWR) using a Coulter Multisizer 3 counter with a 50 μm orifice and an aspiration volume of 250 μL . Algae were separated from the growth medium by centrifugation (4 min. at 3300g) in 50 mL centrifuge tubes (Corning). Pellets were then re-suspended and washed in the exposure matrix (2x). The final algal was spiked into the experimental solutions. Cell numbers and cell surface areas were measured prior to exposure (Coulter Multisizer II).

Biouptake experiments. Experiments were carried out in 1L polycarbonate erlenmeyers, previously soaked in 2% HNO_3 (Fisher) and rinsed 7 times in MilliQ grade water. At the beginning of the 1 h exposure experiment, concentrated algae were transferred into aliquots of exposure media in order to obtain a cell surface density of $0.15 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ (ca. 8×10^4 cells L^{-1}). Bioaccumulation was stopped every 15 minutes by adding 0.5 mL of 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) [49, 50] to 50 mL of exposure media (1 replicate, 1 min. contact time). EDTA has the additional advantage of removing most of the cell wall bound Ce, while not extracting internalized Ce (Fig. S3,[117]). Following the addition of EDTA, algae were filtered over 3 μm nitrocellulose filters (Millipore). Filters were collected

in 15 mL centrifugal tubes and digested in 0.5 mL of ultrapure HNO₃ (70% v/v) in a 80±2 °C water bath until colorless. Digested filters and algae were diluted 20x in Milli-Q grade water prior to analysis by ICP-MS. Cerium concentrations were measured at the time of the preparation of the exposure media, immediately before the exposure experiment, at the end of the exposure experiment and after the addition of EDTA in order to verify mass balances. Mass balance was considered acceptable for recoveries between 80 and 110%. Ce³⁺ concentrations were calculated from WHAM VII using measured concentrations of dissolved cerium.

Competition and complexation experiments. **Competition** experiments were performed with a total cerium concentration of 5x10⁻⁸ M and calcium (Ca(NO₃)₂) concentrations that varied from 10⁻⁶ to 10⁻³ M. The ionic strength of all experimental media was adjusted to 10⁻² M using NaNO₃. **Complexation** experiments were performed using 10⁻⁷ M Ce and 1, 5, 10 or 15 mg L⁻¹ of SRFA at pH 7. Uptake was determined at a single time point after 60 minutes of exposure. All other conditions and procedures were identical to regular uptake experiments described.

4.5 Results and Discussion

Cerium speciation determinations

Several authors have indicated that when Ce(III) is added to water, it will be the dominant species [7, 8], even at circumneutral pH where Pourbaix diagrams predict that Ce(IV) are thermodynamically stable [8]. Based solely on thermodynamic calculations of Ce(III), there are few predicted differences in Ce speciation between pH 4.0 and pH 6.0 (WHAM 7.0, Figure 20). Although the concentration of free ion is predicted to decrease by 13% at pH 7.0 and 94% at pH 8.0 (due mainly to the formation of $\text{Ce}(\text{CO}_3)_x^{3-2x+}$), there is no indication that insoluble Ce species will form. Given the thermodynamic prediction of Ce(IV) and other data in the literature indicating the poor solubility of lanthanides at neutral pH values [8, 118, 119], ultrafiltration experiments (3 kDa poresize) were performed to evaluate whether precipitates were forming in the experimental media. Indeed, Ce concentrations in the ultrafiltrate decreased by 38% at pH 6.0, 75% at pH 7.0 and 61% at pH 8.0 (Figure 13), with increasing metal concentration measured in the retentate.

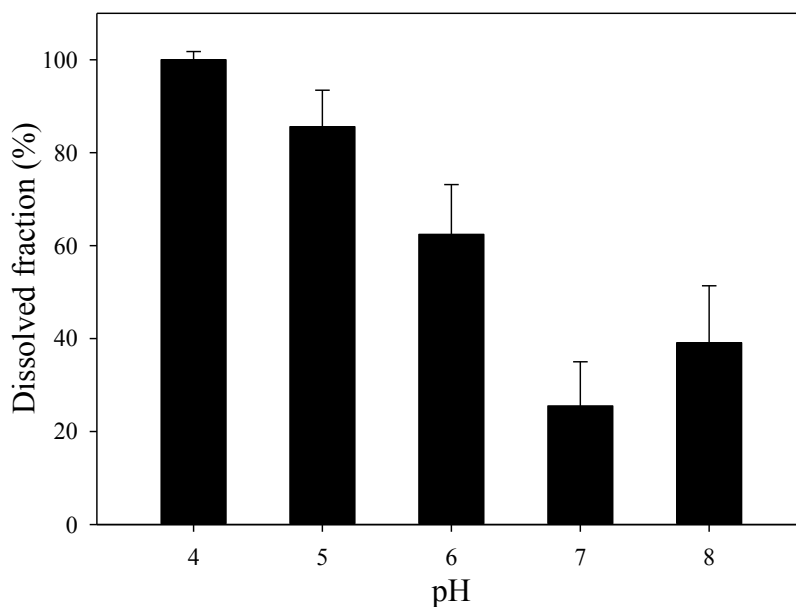


Figure 13. Dissolved (< 3 kDa) cerium measured by centrifugal ultrafiltration. Error bars indicate standard deviations for experiments performed in triplicate. The concentration of cerium was 3.5×10^{-8} M.

Complementary measurements were performed using SP-ICP-MS to confirm these observations. In the presence of dissolved metal, the signal read by the mass spectrometer remains constant over time, indicating a constant “stream” of metal making its way to the detector [96, 101]. In the presence of particles, bursts of counts will be observed as the ionized particles reach the mass spectrometer. At pH 7.0, significantly higher numbers of pulses, attributed to small Ce (nano)particles were observed as compared to pH 5.0. Particle numbers generally increased with pH - no particles were detected at pH 4.0 or 5.0, and particles numbers increased from pH 6.0 to 7.0 and then decreased at pH 8.0. Due to the unknown chemical composition of the particulate, it was difficult to extract particle sizes and numbers from this analysis. Nonetheless, if a particle density of 7130 kg m^{-3} is assumed (i.e. density of CeO_2), then an average particle size of 60 nm would be inferred from the SP-ICPMS determinations.

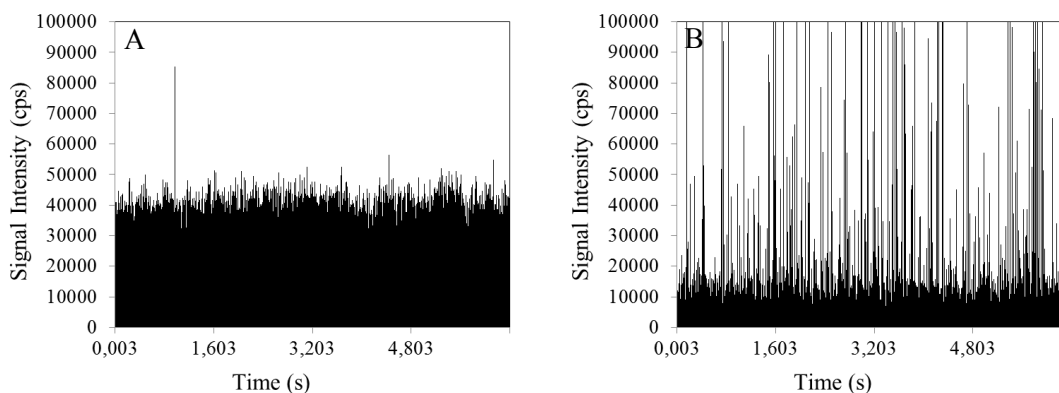


Figure 14. SP-ICP-MS measurements of Ce solutions at A: pH 5.0 and B: 7.0. Instrument dwell time of 3 ms with 25 000 reads and a Ce concentration of $3.5 \times 10^{-8} \text{ M}$.

While the trend in particulate Ce was similar for SP-ICPMS and ultrafiltration, higher particle concentrations were observed in the latter technique. There are three probable causes leading to the lower particle numbers by SP-ICPMS: (i) Ce nanoparticles (oxides in general) may not be quantitatively nebulized in SP-ICPMS; (ii) threshold levels to distinguish dissolved from particulate Ce are set to ensure that nanoparticles are not overestimated, likely resulting in some particles being attributed to the dissolved fraction; (iii) ultrafiltration may overestimate particle concentrations (primarily via adsorption of dissolved species on the ultrafiltration device). In spite of the differences in observed/inferred particle numbers, it was clear that

significant concentrations of colloidal Ce were formed at the intermediate pH values (pH 6.0-8.0), especially when compared to the lower pH values.

As mentioned above, the formation of $\text{Ce}(\text{OH})_3$ is not predicted by thermodynamic calculations (Figure 20) except under reducing conditions at high pH ($\text{pH} > 10$). Other possibilities to explain the presence of colloidal Ce at circumneutral pH include the formation of insoluble CeO_2 (or $\text{Ce}(\text{OH})_4$) particles following the oxidation of Ce(III) to Ce(IV) [8] or the formation of meta-stable, possibly carbonated, colloidal species. Certainly, the solubility of Ce is at its lowest in a system containing carbonates [38, 120]. Even though Ce(IV) is thought to be minor in a system where Ce(III) is the starting element [7, 8], Ce(IV) species are thermodynamically favored in oxic waters (above ca. pH 6.0). Furthermore, Ce(IV) species can be stabilized by complexation, including with CO_3^{2-} [39].

Some further information into the chemical speciation of Ce can be gained from excitation-emission measurements. Ce(III) shows two excitation maxima and a broad fluorescence band attributed to the $4f \leftarrow 5d$ relaxation of its $4f^1$ electron [77, 78]. Fluorescence is thus directly dependent upon coordination sphere of the octa-hydrated species $[\text{Ce}(\text{OH}_2)_8]^{3+}$. Indeed, a decrease in the fluorescence intensity of the 250 nm (λ_{ex})-356 nm (λ_{em}) peak (Figure 15A) and a corresponding red shift in the fluorescence emission maxima (Figure 15B) was observed as the pH increased from 5.0 to 7.0. The red shift of the 356 nm emission peak was observed for both excitation of the 250 nm and the 260 nm excitation peaks (Figure 15B). The decrease in fluorescence intensity is consistent with a decrease of the free ion concentration in solution [79], which can either be explained by the formation of the hydroxo or carbanato complexes [7] or by the increase in colloidal species that were observed at the intermediate pH values. The lower fluorescence intensity at pH 4.0 is attributed to quenching by NO_3^- ions which are present in excess in this condition [79].

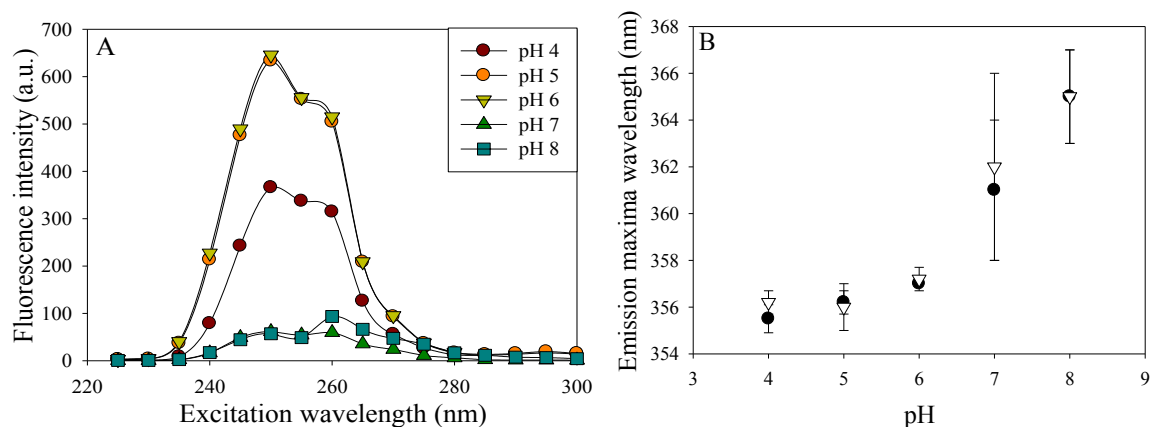


Figure 15A. Variation of fluorescence intensity at λ_{em} 356 nm for several pH. B. Variation of fluorescence maxima at λ_{ex} 250 nm (full circles) and 260 nm (empty triangles).

In the natural environment, humic substances are ubiquitous and are likely a strong ligand for Ce(III) binding. Therefore, the complexing capacity of the Suwannee River fulvic acid was determined from the quenching of NOM fluorescence during titration with the metal (Figure 16). Titration experiments were carried out in the same media as was used for biouptake experiments.

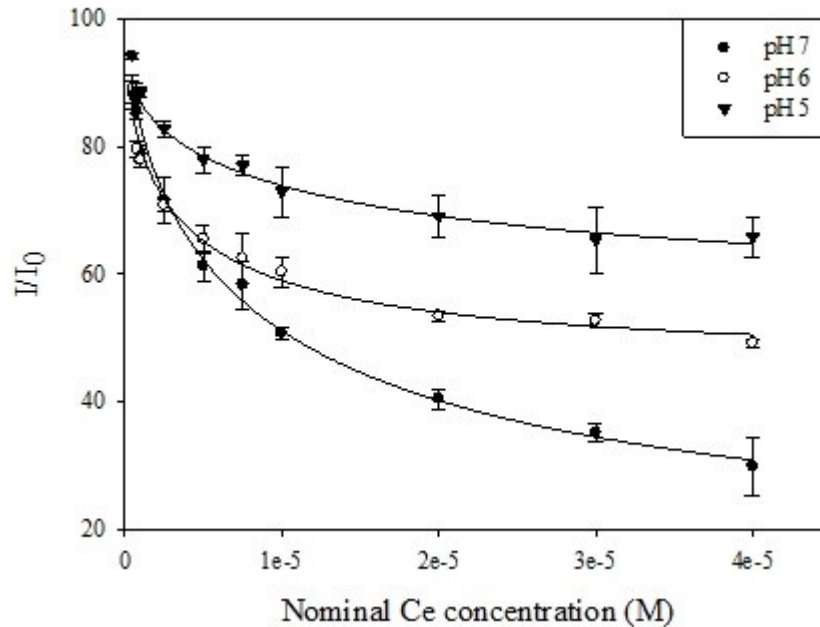


Figure 16. Fluorescence quenching titration of SRFA by Ce in various pH conditions. The fulvic acid concentration is 1 mg/L and the ionic strength is $I = 0.01$ M. Error bars are for $N = 3$.

Table II. Binding parameters of Suwannee River fulvic acid to Ce determined in pH buffered solutions ($I=0.01$ M) in the presence of 10^{-5} M of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

pH	logK	C_L (μM)
5.0	5.83 ± 0.03	0.336 ± 0.005
6.0	6.03 ± 0.05	0.39 ± 0.05
7.0	5.39 ± 0.04	0.3 ± 0.2

Values for the apparent binding constants (Table II) indicate that the complexing capacity of the SRFA didn't appear to be pH dependant. Although variations between the log K at pH 5.0 and 6.0 were attributed to noise in the data, the apparent decrease observed at pH 7.0 could be attributed to a decrease in Ce^{3+} concentrations due to binding with and CO_3^{2-} (Figure 20) and potentially the formation of Ce colloids (above). Although fluorescence quenching attained a constant value at similar Ce concentrations (i.e. similar C_L), the concurrent influence of pH on both fluorescence and binding may have been responsible for some of the noise in the binding

constants. Nonetheless, at pH 5, where Ce is predominantly found as Ce^{3+} and for which the SRFA is predominantly deprotonated ($\text{pK}_a = 3.76$, [121, 122]), cerium is strongly bound by the NOM with values comparable to Cu and Hg ($\text{Log } K \sim 5$ at pH 6, [34]).

Overall, speciation studies have demonstrated that Ce is likely not at equilibrium at pH6 and above, greatly reducing the relevance of simple toxicity tests that are performed in the absence of added ligand. Colloidal Ce precipitates or metastable Ce species most likely occurred with hydroxide or carbonate. In the absence of added ligand, a majority of the Ce likely remained as Ce^{3+} at low pH (below pH 6.0) and as colloidal species (likely Ce(IV) species such as $\text{Ce}(\text{OH})_4$ or CeO_2 at higher pH (at and above pH 6.0). Ce was strongly bound by natural organic matter. Conditional stability constants (pH 5.0, 6.0 and 7.0) for the Ce-SRFA complexes were between $\log K = 5.39$ and 6.03 .

Cerium biouptake

In order to evaluate the Ce bioavailability, biouptake was measured at pH 5.0 and pH 7.0. Cerium internalization was linear with time for short term (1 h) exposure (Figure 24). An internalization flux, J_{int} , was determined from the slope of each biouptake curve and internalization fluxes were plotted against the Ce^{3+} concentration, which was determined by thermodynamic modelling (WHAM) of the dissolved (<3 kDa) measured Ce concentrations.

At pH 5.0, uptake kinetics could be described by the Michaelis-Menten equation, from which the Michaelis-Menten (dissociation) constant, K_M , and the maximum uptake flux, J_{max} , could be determined (Figure 17A). All of the internalization fluxes were significantly lower than the calculated diffusion limited fluxes, indicating that internalization was rate-limiting. Under such conditions, it is reasonable to assume that a (pseudo-) equilibrium is occurring between the metal in solution and the biological uptake sites [123]. An affinity constant of $(1.8 \pm 0.9) \times 10^7$ ($\log K = 7.3$) was obtained, which is very similar to values obtained for other REE for this same organism (Tm: $\log K = 7.1$, pH 6.0; Eu: $\log K = 7.0$, pH 6.0; Sm: $\log K = 7.0$, pH 6.0; [124] and unpublished data) but higher than values observed for some of the divalent metals (Cd: $\log K = 6.0$, pH 7.0, [51]; Ni: $\log K = 5.1$, pH 6.0, [52]; Pb: $\log K = 5.9$, pH 6.0, [105]; Cu: $\log K = 5.8$, pH 6.0, [105]).

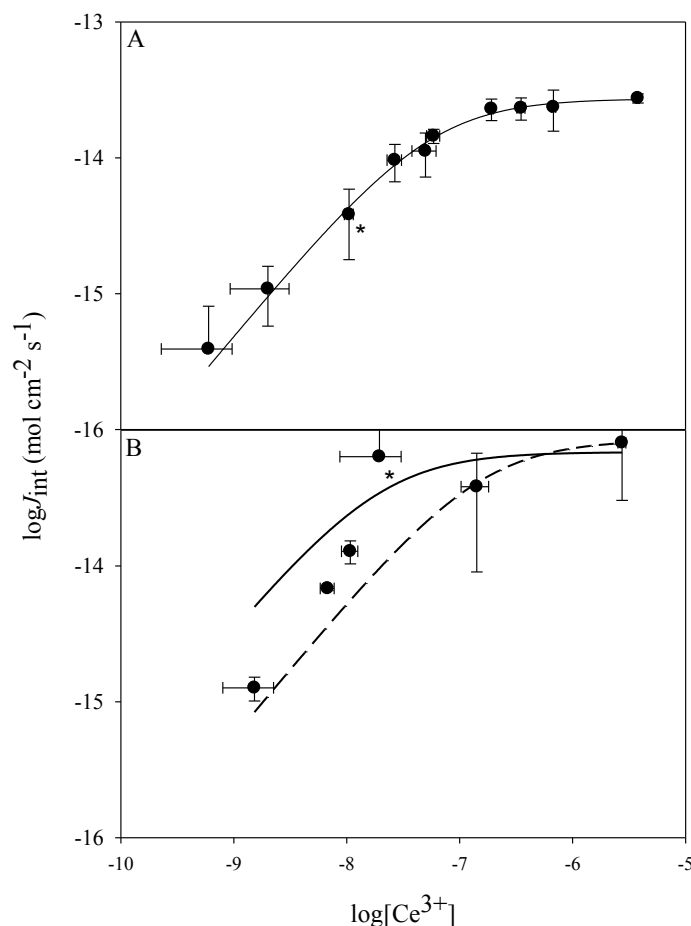


Figure 17. Plots of cerium internalisation fluxes as a function of the concentration of Ce^{3+} at (A) pH 5.0 and (B) pH 7.0. The solid lines represent the Michaelis-Menten plot determined using (A) $K_M = (5.5 \pm 0.3) \times 10^{-8} \text{ M}$ and $J_{\text{max}} = (2.7 \pm 0.7) \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and (B) $K_M = (2 \pm 8) \times 10^{-8} \text{ M}$ and $J_{\text{max}} = (7 \pm 7) \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. In (B), the dashed line represents the Michaelis-Menten plot that is obtained if point (*) is excluded, i.e., $K_M = (1.5 \pm 0.7) \times 10^{-7} \text{ M}$ and $J_{\text{max}} = (8 \pm 2) \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The maximum diffusion flux of Ce is out of scale.

Table III. Parameters for the biouptake of Cerium by *Chlamydomonas reinhardtii* for two different pH values. The star indicates the biouptake parameters at pH 7.0 if point (*) is excluded.

pH	K_s (M^{-1})	$\log K_s$	J_{\max} ($\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)
5.0	$(1.8 \pm 0.9) \times 10^7$	7.3	$(2.7 \pm 0.7) \times 10^{-14}$
7.0	$(5 \pm 20) \times 10^7$	8	$(7 \pm 7) \times 10^{-14}$
7.0*	$(6 \pm 3) \times 10^7$	8	$(8 \pm 2) \times 10^{-14}$

At pH 7.0, the linearity of the uptake plots was much worse and the error bars for replicate measurements much greater (Figure 17B). Nonetheless, it was possible to conclude that for a similar free Ce(III) ion concentration, uptake fluxes were lower at pH 5.0 than at pH 7.0 (significantly lower at the lowest cerium concentrations that were measured, Student's t-test with 95% confidence interval). While fairly good precision was obtained for the $\log K$ value at pH 5.0, the value at pH 7.0 was very different depending upon whether the point collected at 10^{-8} M Ce was included or excluded (Table III). The large variability in data collected at pH 7.0 reflects the complexity of Ce speciation in the neutral and alkaline pH values, which is in large part attributed to the presence of the colloidal particles.

The differences observed between the internalization fluxes at pH 5.0 and 7.0 likely resulted from at least two effects: (i) there is greater competition of H^+ for Ce uptake sites at pH 5.0 as opposed to pH 7.0 and (ii) the Ce colloids may “stick” to the cell wall, even after washing with the EDTA. The observation of a lower uptake flux at pH 5.0 as compared to pH 7.0 has been seen repeatedly with other metals (e.g. [125]). Nonetheless, the large variability in the uptake flux values at pH 7.0, coupled with the SP-ICP-MS and ultrafiltration data presented earlier, strongly suggested that colloidal Ce was also being accumulated by the algae at the higher pH. In studies comparing the effect of free Ce(III) to CeO_2 nanoparticles, Röhder et al. [106] concluded that only the free ion was interacting with biological uptake sites. In other studies on trivalent metals, Crémazy et al. [67] demonstrated an important variation of Sc uptake fluxes with pH. In fact, between pH 5 and 7, the value of K_s increased by 3 orders of magnitude, which was clearly not observed here. In that study, the authors concluded that the

hydroxo Sc species contributed to increased bioaccumulation at neutral (and higher) pH values.

Given the strong effect of H^+ on Ce uptake, the role of other competitors such as Ca^{2+} were also explored. Experiments were performed using a total nominal cerium concentration of 5×10^{-8} M with an increasing concentration of Ca^{2+} (10^{-6} - 10^{-3} M). When comparing similar total concentrations of added cerium (Figure 18A vs. 18B), biouptake fluxes were lower at pH 7.0 as compared to pH 5.0. This observation was due to the higher proportion of Ce^{3+} at pH 5.0 (4×10^{-8} M) than at pH 7.0 (6×10^{-9} M) – taking into account loss due to adsorption on flask wall, particle formation and inorganic speciation. Contrary to Figure 17, Figure 18A and 18B compared equivalent concentrations of total Ce (rather than Ce^{3+}). At pH 5.0, a 10 fold increase in $[Ca^{2+}]$ resulted in a 3 fold decrease in cerium biouptake. Using equation 4, a stability constant of $(2.1 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($\log K = 4.3$, solid line in Figure 18A) could be estimated for the binding of Ca to the Ce transporter. This value is in close agreement with values of K_{Ca} calculated for competition experiments with Cd [51] and U [126]. On the other hand, as above, experiments performed at pH 7.0 proved to be difficult to reproduce, resulting in large error bars on the data points (Figure 18B). In this case, no significant differences were observed among the fluxes measured at the different Ca concentrations.

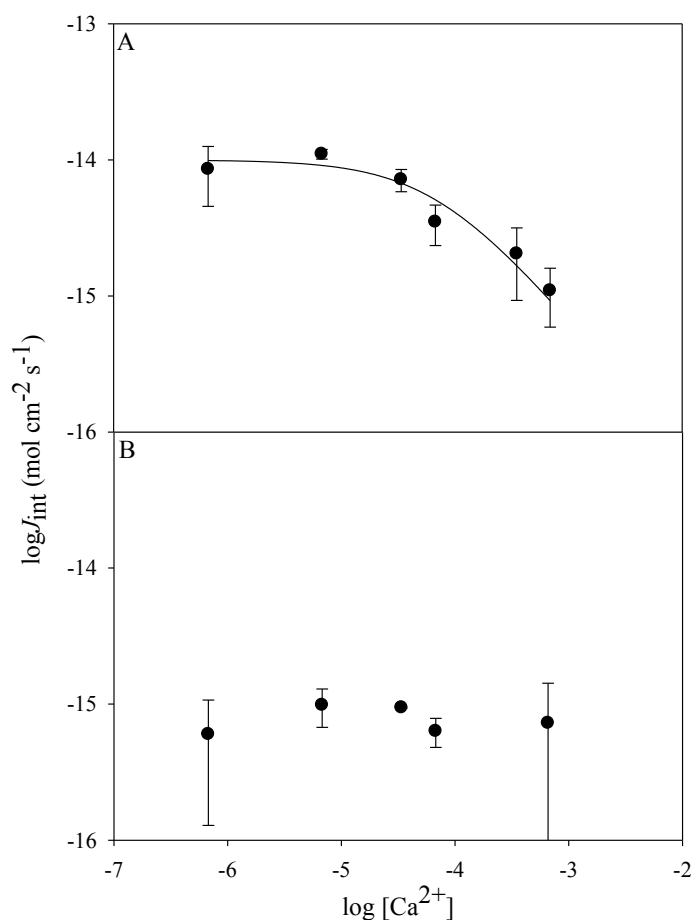


Figure 18. Effect of an increasing calcium concentration on cerium uptake fluxes at pH 5.0 (A) and pH 7.0 (B). The nominal total concentration of Ce was 5×10^{-8} M, corresponding to free ion concentrations of 4×10^{-8} M (pH 5.0) and 6×10^{-9} M (pH 7.0) determined by WHAM 7.0 after correction for particle formation.

Natural organic matter (NOM) is ubiquitous in freshwaters and it is likely that much Ce in natural waters will be found in complexes rather than metastable colloidal forms. As shown above, the SRFA forms strong complexes with Ce. In the presence of as little as 1 mg L^{-1} , Ce biouptake was decreased by a little more than 2 fold (Figure 19). Further increases in NOM decreased the uptake to just above detection limits at 10 mg L^{-1} . If we assume that biouptake depends solely upon the dissolved, non-complexed Ce (likely Ce^{3+}) (i.e. basis of the Biotic Ligand Model), it is possible to model the predicted reduction in uptake using the equilibrium constants determined above for Ce complexation by the SRFA. Though bioaccumulation was

slightly higher than predicted at the highest NOM concentrations, this was observed in previous research with Pb[60] and Eu [124]. It is nonetheless well into the error bars of the experimental data. While results obtained in the absence of NOM show that it is difficult to control Ce chemistry in waters containing no ligands, the strong complexation of Ce by NOM will likely be extremely important for controlling the bioavailability of this element.

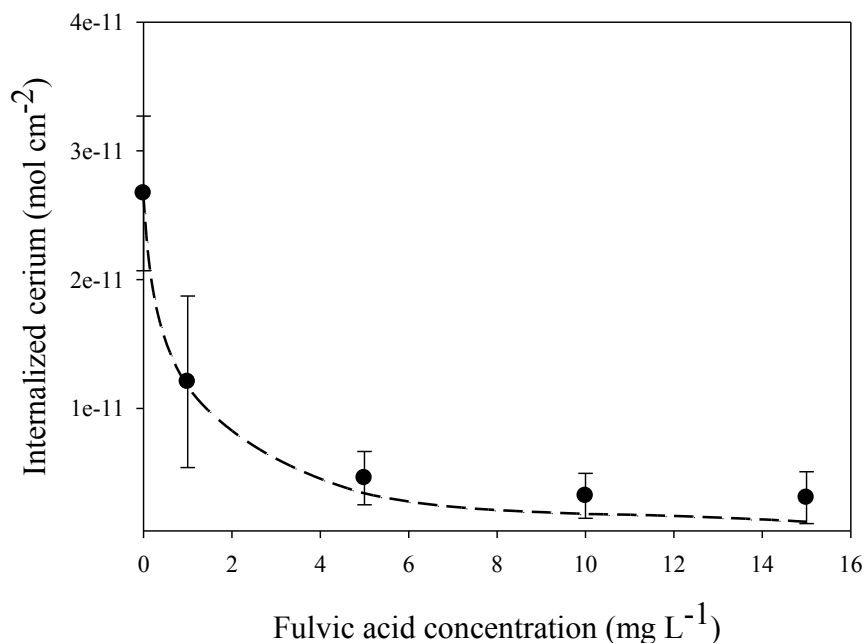


Figure 19. Effect of fulvic acid on cerium uptake at pH 7. The dashed line represents the predicted biouptake on the basis of the free ion concentration determined using the affinity constant established in the fluorescence quenching titration experiments ($\log K = 5.39 \pm 0.04$) and calculations by WHAM 7.0 software. The error bars on the biouptake experiments are for $N=3$.

4.6 Conclusion

In light of these results, one must clearly question our capacity to properly perform toxicological assays and risk assessments for Ce under circumneutral pH conditions. In most assays, metal salts are added to non-complexing media. Given the slow kinetics of most redox and precipitation reactions, it is unlikely that stable conditions are present in the assays at and above pH 6.0. This change in the metal solubility is not predicted by current speciation software (which generally does not account for oxidation-reduction) and therefore, when

conducting biological assays, measurements of dissolved cerium must be made in order to establish the concentration of the free ion in solution. Correspondingly, the pH effect on uptake was extremely important since it led to proton competition with the uptake sites, the formation carbonato- and hydroxo- complexes and the formation of colloidal (likely metastable), likely Ce(IV) species. Protection of the organism by the presence of Ca in solution did prove efficient at pH 5.0, however, this was unexpectedly not the case at pH 7.0, where no decrease in Ce uptake was observed even for an increase in Ca concentration of 2 orders of magnitude (keeping in mind the large variation on data points). Finally, in environmental media (as opposed to that of bioassays), Ce is likely to be strongly complexed. The binding of Ce by the Suwannee River fulvic acid strongly decreased its biouptake.

4.7 Acknowledgements

Funding for this work is provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the *Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies* and Environment Canada. Technical and scientific assistance from Madjid Hadioui was greatly appreciated.

4.8 Supplementary information for *Linking the chemical speciation of Ce to its bioavailability*

Philippe El-Akl[†], Scott Smith[‡], Kevin J. Wilkinson^{†*}

[†]Biophysical Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal H3C 3J7, Canada

[‡]Department of Chemistry, Wilfrid Laurier University 75 University Avenue West, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3C5

*Corresponding author: Phone: +1-514 343 6741; fax: +1-514 343 7586

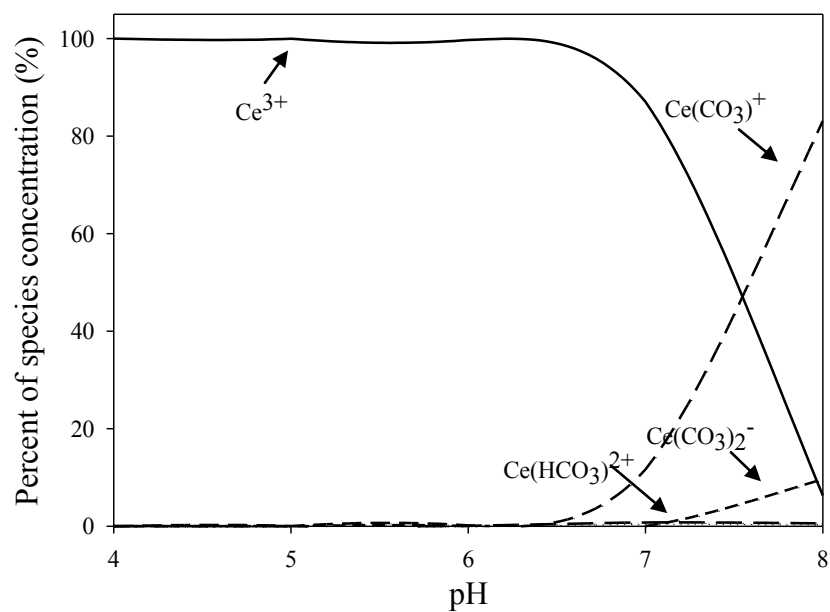


Figure 20. Speciation of cerium as a function of pH, as obtained from the WHAM7 software. The WHAM database was updated using constants from Hayes et al. [127] to take into account Ce(OH)_2^+ and Ce(OH)_3 species (which were nonetheless negligible). Modelling was performed using a total Ce concentration of 1×10^{-7} M, $T = 20^\circ\text{C}$; $p\text{CO}_2 = 3.9 \times 10^{-4}$ atm.

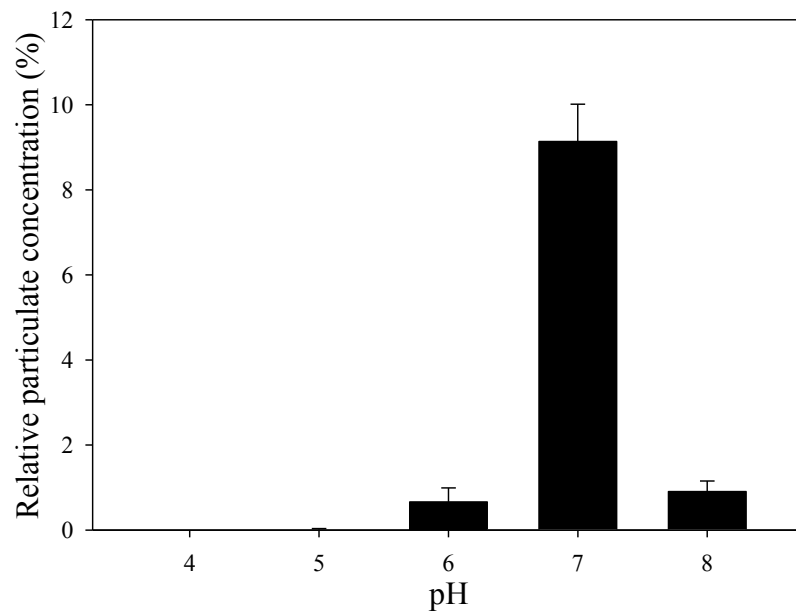


Figure 21. Particulate Ce measured by SP-ICP-MS using a dwell time of 3 ms and 25000 reads (n=3).

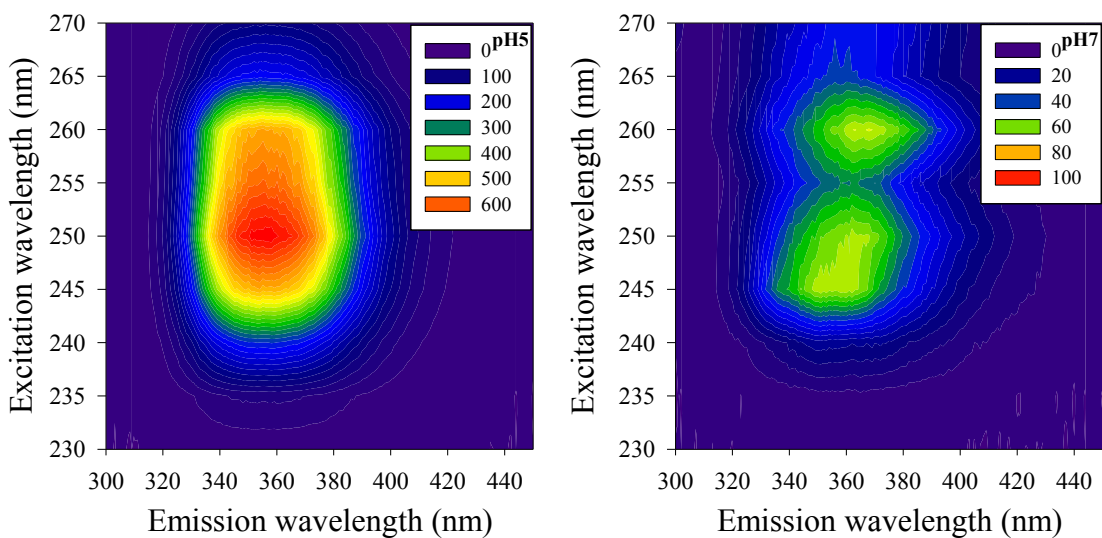


Figure 22. Excitation-emission matrices for Ce at pH 5.0 and 7.0. The cerium concentration was 5×10^{-5} M at an ionic strength of 0.01 M.

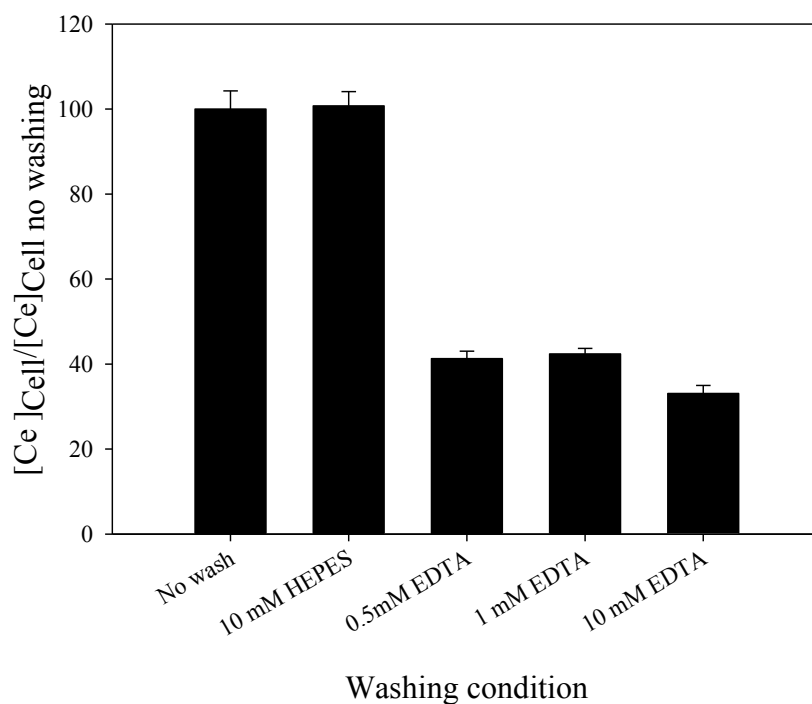


Figure 23. Wash efficiency of EDTA after a 1 h exposure of Ce to *Chlamydomonas reinhardtii* at pH 7. N=3.

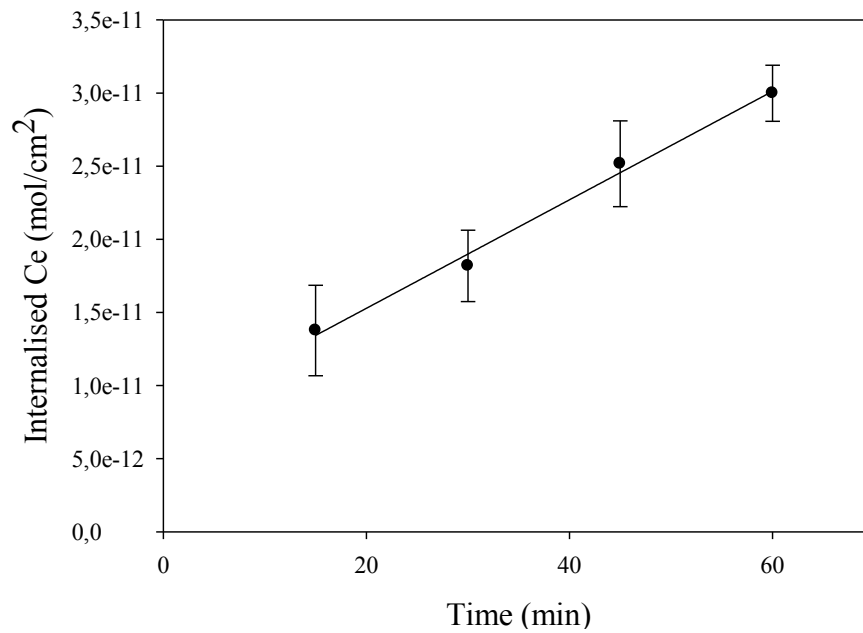


Figure 24. Ce biouptake of *Chlamydomonas reinhardtii* as a function of time at pH 7.0 using a nominal metal concentration of 1×10^{-7} M. Linear regression parameters: $a = 3.7 \times 10^{-13}$ mol cm⁻² min⁻¹ and $b = 7.9 \times 10^{-12}$ mol cm⁻².

5. Conclusion

En résumé, cette étude a permis de faire le lien entre la spéciation du cérium et son interaction avec un ligand biotique sur la surface des cellules algales en fonction : (i) du pH; (ii) de la présence de matière organique naturelle et (iii) de la compétition avec le calcium. Il y a un consensus dans la littérature sur la complexité derrière la spéciation de ce lanthanide en fonction des conditions environnementales [39, 43, 45]. La formation d'oxyde de Ce (CeO_2) aux pH neutres et basiques ainsi que la complexation par les carbonates ont donné lieu, ici, à un déplacement bathochrome de 10 nm des λ_{max} d'excitation et d'émission de fluorescence du métal. Un déplacement de la sorte indique un changement dans la sphère de coordination du Ce qui diminue la distance entre les orbitales impliquées dans la transition électronique. Les mesures spectroscopiques ne sont pas aussi intéressantes d'un point de vue quantitatif qu'elles le sont d'un point de vue qualitatif. L'interprétation des bandes observées en spectroscopie passe par l'étude des éléments de symétrie de la molécule en question. Dépendamment du groupe de symétrie auquel appartient le complexe métallique, il est possible de prédire le nombre de transitions électroniques qui seront observables en spectroscopie UV-visible. Approfondir les connaissances sur la spectroscopie de ce métal en étudiant ses éléments de symétrie est une méthode prometteuse pour déterminer plus précisément l'espèce majoritaire qui se trouve en solution.

Le changement dans la spéciation du cérium est aussi visible lors des expériences d'ultrafiltration et d'ICP-MS en mode simple particule. La transition d'une eau à pH 6 vers une eau à pH 7 est marquée par une diminution considérable de 75 % du métal dissout, selon les résultats d'une filtration à travers des pores de 3 kDa. En SP-ICP-MS, ce phénomène est observé par l'enregistrement de signaux de haute intensité par rapport au signal généré par les espèces monoatomiques du métal. Le compte de particules en SP-ICP-MS atteint un maximum à pH 7 et chute de façon importante à pH 8. L'hétérogénéité des espèces du cérium fait en sorte qu'il est difficile de tirer des conclusions certaines et quantitatives des analyses en SP-ICP-MS. Il est cependant indéniable qu'une espèce particulière du métal se forme en solution au fur et à mesure que l'on se rapproche de la neutralité.

La rapidité à laquelle les expériences d'ultrafiltration sont effectuées rend cette méthode efficace pour analyser le milieu d'exposition avant les expériences de bioaccumulation. Cependant, la technique de résine échangeuse d'ion (IET) serait une alternative intéressante afin d'obtenir une meilleure sensibilité sur une plus grande gamme de concentration de métal. En effet cette méthode s'est montrée robuste lors de la spéciation de l'argent entre sa forme particulaire et ionique [99]. Elle serait même la technique de choix pour répondre au problème du bruit causé par la fraction dissoute du cérium lors de l'analyse en SP-ICP-MS [101]. Installer une résine avant l'entrée de l'échantillon dans l'instrument permettrait de réduire considérablement le signal interférant à l'analyse des particules en solution.

L'investigation sur la constante d'interaction entre le Ce et l'acide fulvique a permis d'évaluer une constante de $\log K = 5.39 \pm 0.04$. Cette constante est comparable à celle trouvée pour d'autres éléments par la même méthode. Les résultats montrent que cette constante n'est pas vraiment affectée par le pH entre les pH 5 et 7. Ceci implique que, dans les eaux naturelles, on peut s'attendre à ce que le pouvoir complexant de la SRFA soit le même pour un grand nombre de milieux aquatiques.

L'interaction entre le cérium et le ligand biotique à la membrane cellulaire de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* a aussi été étudiée sous de multiples conditions environnementales. À pH 5.0, la constante conditionnelle de stabilité avec le ligand biotique était de $K_S = (3.4 \pm 0.8) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ avec un flux maximal d'internalisation de $J_{\max} = (2.7 \pm 0.7) \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour d'autres lanthanides et plus élevées que celles observées pour des métaux divalents. Malgré cela, une étude sur l'effet intracellulaire du métal a montré que de la toxicité au cérium est reliée à sa forme ionique, mais qu'elle est moindre que celle observée par d'autres métaux tels que l'argent [106].

Lorsque le pH est augmenté à 7.0, les expériences sont plus difficiles à reproduire et la variabilité entre les résultats augmente. Une explication possible de ces observations est que l'état d'équilibre n'est pas encore atteint et donc la spéciation du cérium n'est pas complète au moment de l'exposition à l'algue. Néanmoins, l'analyse des résultats indique une inhibition non compétitive des protons sur l'internalisation du cérium. En effet, J_{\max} augmente avec une

augmentation du pH. La grande variabilité de K_s à pH 7.0 rendait difficile l'interprétation des résultats, mais selon l'inhibition non compétitive ce paramètre semblait demeurer constant. Il était cependant intéressant d'observer qu'en général, à une concentration d'ion libre identique, les flux d'internalisation étaient plus élevés à pH 7.0.

Le calcium, élément omniprésent dans l'environnement, partage le même transporteur que le cérium pour son entrée dans *C. reinhardtii*. Ceci est confirmé à pH 5.0 lorsqu'une augmentation de dix fois de la concentration en Ca a diminué de trois fois les flux d'internalisation de Ce. Encore une fois, les résultats à pH 7.0 étaient difficilement reproductibles et, encore plus inquiétant, aucune diminution significative de l'internalisation du Ce n'a été observée à de hautes concentrations en Ca. Il est probable que l'état d'équilibre n'a pas été atteint dans ces conditions aussi, ce qui rend l'interprétation des résultats difficile.

Malgré la variabilité des résultats obtenus à pH 7.0, l'ajout de MON au milieu d'exposition dans cette condition de pH confirme tout de même que le pouvoir de complexation de l'acide fulvique aura l'effet de diminuer l'internalisation du métal dans l'algue. Ceci montre aussi que l'interaction avec le ligand biotique dépend de la concentration du métal sous sa forme d'ion libre en solution.

À la lumière de ces résultats, il est raisonnable d'affirmer que dans des conditions légèrement acides le BLM arrive à prédire la thermodynamique autour de l'internalisation du Ce chez l'algue, *Chlamydomonas reinhardtii*. Cependant, une investigation plus approfondie est nécessaire en ce qui concerne les eaux neutres. Une étude plus complète sur la cinétique de la spéciation de ce métal est nécessaire afin d'arriver à des résultats plus reproductibles. Il est recommandé de conduire les expériences à pH 7 en variant le temps d'équilibre entre la préparation des solutions et le début de l'exposition. Il va sans dire que la complexité d'un milieu naturel ouvre la porte à de nombreuses autres expériences, que ce soit en variant le type de ligand qui se trouve en solution, la nature des ions compétiteurs, la présence de matériaux adsorbants tels que l'oxyde de fer et l'effet de facteurs physiques tels que la température.

6. Bibliographie

- [1] Hurst C. 2010. China's Rare Earth Elements Industry: What Can the West Learn? Institute for the Analysis of Global Security (IAGS).
- [2] Haxel G.B. HJB, Orris G.J. 2002. Rare Earth Elements - Critical Ressources for High Technology. In Interior USDot, ed.
- [3] de Sousa Filho PC, Gomes LF, de Oliveira KT, Nerj CR, Serra OA. 2009. Amphiphilic cerium(III) beta-diketonate as a catalyst for reducing diesel/biodiesel soot emissions. *Applied Catalysis a-General* 360:210-217.
- [4] Zhai Y, Zhou K, Xue Y, Qin F, Yang L, Yao X. 2013. Synthesis of water-soluble chitosan-coated nanoceria with excellent antioxidant properties. *Rsc Advances* 3:6833-6838.
- [5] Pikalova EY, Murashkina AA, Maragou VI, Demin AK, Strekalovsky VN, Tsiakaras PE. 2011. CeO₂ based materials doped with lanthanides for applications in intermediate temperature electrochemical devices. *International Journal of Hydrogen Energy* 36:6175-6183.
- [6] de Lima JF, Serra OA. 2013. Cerium phosphate nanoparticles with low photocatalytic activity for UV light absorption application in photoprotection. *Dyes and Pigments* 97:291-296.
- [7] Bouchaud B, Balmain J, Bonnet G, Pedraza F. 2012. pH-distribution of cerium species in aqueous systems. *Journal of Rare Earths* 30:559-562.
- [8] Yu P, Hayes SA, O'Keefe TJ, O'Keefe MJ, Stoffer JO. 2006. The phase stability of cerium species in aqueous systems - II. The Ce(III/IV)-H₂O-H₂O₂/O₂ systems. Equilibrium considerations and pourbaix diagram calculations. *Journal of the Electrochemical Society* 153:C74-C79.
- [9] Uchida S, Tagami K, Tabei K, Hirai I. 2006. Concentrations of REEs, Th and U in river waters collected in Japan. *Journal of Alloys and Compounds* 408:525-528.
- [10] Ryu JS, Lee KS, Lee SG, Lee D, Chang HW. 2007. Seasonal and spatial variations of rare earth elements in rainwaters, river waters and total suspended particles in air in South Korea. *Journal of Alloys and Compounds* 437:344-350.
- [11] Goldstein SJ, Jacobsen SB. 1988. REE in the Great-Whale River estuary, Northwest Quebec. *Earth and Planetary Science Letters* 88:241-252.
- [12] Batley GE, Halliburton B, Kirby JK, Doolette CL, Navarro D, McLaughlin MJ, Veitch C. 2013. Characterization and ecological risk assessment of nanoparticulate CeO₂ as a diesel fuel catalyst. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32:1896-1905.
- [13] Manier N, Bado-Nilles A, Delalain P, Aguerre-Chariol O, Pandard P. 2013. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO₂ nanomaterials towards freshwater microalgae. *Environmental Pollution* 180:63-70.
- [14] Rodea-Palomares I, Gonzalo S, Santiago-Morales J, Leganes F, Garcia-Calvo E, Rosal R, Fernandez-Pinas F. 2012. An insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. *Aquatic Toxicology* 122:133-143.

- [15] Van Hoecke K, De Schamphelaere KAC, Van der Meeren P, Smagghe G, Janssen CR. 2011. Aggregation and ecotoxicity of CeO₂ nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. *Environmental Pollution* 159:970-976.
- [16] Van Hoecke K, Quik JTK, Mankiewicz-Boczek J, De Schamphelaere KAC, Elsaesser A, Van der Meeren P, Barnes C, McKerr G, Howard CV, Van De Meent D, Rydzynski K, Dawson KA, Salvati A, Lesniak A, Lynch I, Silversmit G, De Samber B, Vincze L, Janssen CR. 2009. Fate and Effects of CeO₂ Nanoparticles in Aquatic Ecotoxicity Tests. *Environmental Science & Technology* 43:4537-4546.
- [17] Zhang P, He X, Ma Y, Lu K, Zhao Y, Zhang Z. 2012. Distribution and bioavailability of ceria nanoparticles in an aquatic ecosystem model. *Chemosphere* 89:530-535.
- [18] Zhang P, Ma Y, Zhang Z, He X, Zhang J, Guo Z, Tai R, Zhao Y, Chai Z. 2012. Biotransformation of Ceria Nanoparticles in Cucumber Plants. *Acs Nano* 6:9943-9950.
- [19] Trujillo-Reyes J, Vilchis-Nestor AR, Majumdar S, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. 2013. Citric acid modifies surface properties of commercial CeO₂ nanoparticles reducing their toxicity and cerium uptake in radish (*Raphanus sativus*) seedlings. *Journal of Hazardous Materials* 263:677-684.
- [20] Chao L, Bofu P, Weiqian C, Yun L, Hao H, Liang C, Xiaoqing L, Xiao W, Fashui H. 2008. Influences of calcium deficiency and cerium on growth of spinach plants. *Biological trace element research* 121:266-275.
- [21] Yuguan Z, Min Z, Luyang L, Zhe J, Chao L, Sitao Y, Yanmei D, Na L, Fashui H. 2009. Effects of cerium on key enzymes of carbon assimilation of spinach under magnesium deficiency. *Biological trace element research* 131:154-164.
- [22] Wu C, Hong F, Liu C, Wang Y, Wu K, Gao F, Yang F. 2006. Regulative mechanism of Ce³⁺ relieves DNA damage caused by Cd²⁺ in the kidney of silver crucian carp. *Biological Trace Element Research* 113:231-245.
- [23] Yang G, Sun Z, Lv X, Deng Y, Zhou Q, Huang X. 2012. Living Target of Ce(III) Action on Horseradish Cells: Proteins on/in Cell Membrane. *Biological Trace Element Research* 150:396-402.
- [24] Xia C-F, Zhao J, Jin J-C, Yuan L, Chen X-Y, Peng W, Jiang F-L, Qin C-Q, Dai J, Liu Y. 2013. Ce(III)-Induced Rice Mitochondrial Permeability Transition Investigated by Spectroscopic and Microscopic Studies. *Biological Trace Element Research* 152:284-291.
- [25] Guo X, Zhou Q, Lu T, Fang M, Huang X. 2007. Distribution and Translocation of Ce¹⁴¹ (III) in Horseradish. *Annals of Botany* 100:1459-1465.
- [26] Thomas PJ, Carpenter D, Boutin C, Allison JE. 2014. Rare earth elements (REEs): Effects on germination and growth of selected crop and native plant species. *Chemosphere* 96:57-66.
- [27] Cheng Y, Li Y, Li RC, Lu JF, Wang K. 2000. Orally administrated cerium chloride induces the conformational changes of rat hemoglobin, the hydrolysis of 2,3-DPG and the

oxidation of heme-Fe(II), leading to changes of oxygen affinity. *Chemico-Biological Interactions* 125:191-208.

[28] Cheng Z, Li N, Cheng J, Hu R, Gao G, Cui Y, Gong X, Wang L, Hong F. 2012. Signal Pathway of Hippocampal Apoptosis and Cognitive Impairment of Mice Caused by Cerium Chloride. *Environmental Toxicology* 27:707-718.

[29] Nordberg M, Duffus JH, Templeton DM. 2004. Glossary of terms used in toxicokinetics - (IUPAC Recommendations 2003). *Pure and Applied Chemistry* 76:1033-1082.

[30] Slaveykova VI, Wilkinson KJ. 2005. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environmental Chemistry* 2:9-24.

[31] vanLoon GW, Duffy SJ. 2003. *Environmental Chemistry A Global Perspective*. Oxford University Press.

[32] 1979. La dureté. Santé Canada. Site consulté: <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/hardness-durete/index-fra.php>

[33] Leenheer JA, Croue JP. 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* 37:18A-26A.

[34] Chen WB, Smith DS, Gueguen C. 2013. Influence of water chemistry and dissolved organic matter (DOM) molecular size on copper and mercury binding determined by multiresponse fluorescence quenching. *Chemosphere* 92:351-359.

[35] Bi Z, Salauen P, van den Berg CMG. 2013. The speciation of lead in seawater by pseudopolarography using a vibrating silver amalgam microwire electrode. *Marine Chemistry* 151:1-12.

[36] Sonke JE. 2006. Lanthanide-humic substances complexation. II. Calibration of humic ion-binding model V. *Environmental Science & Technology* 40:7481-7487.

[37] Town RM, Filella M. 2000. A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters. *Aquatic Sciences* 62:252-295.

[38] Luo YR, Byrne RH. 2004. Carbonate complexation of yttrium and the rare earth elements in natural waters. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 68:691-699.

[39] Pourret O, Davranche M, Gruau G, Dia A. 2008. New insights into cerium anomalies in organic-rich alkaline waters. *Chemical Geology* 251:120-127.

[40] Lead JR, Wilkinson KJ, Starchev K, Canonica S, Buffle J. 2000. Determination of diffusion coefficients of humic substances by fluorescence correlation spectroscopy: Role of solution conditions. *Environmental Science & Technology* 34:1365-1369.

[41] Stumm W, Morgan JJ. 1996. *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, 3 ed. John Wiley & Sons.

[42] Alfimova NA, Felitsyn SB, Matrenichev VA. 2011. Mobility of Cerium in the 2.8-2.1 Ga Exogenous Environments of the Baltic Shield: Data on Weathering Profiles and Sedimentary Carbonates. *Lithology and Mineral Resources* 46:397-408.

[43] Moller P, Bau M. 1993. Rare Earth Patterns with Positive Cerium Anomaly in Alkaline Waters from Lake Van, Turkey. *Earth and Planetary Science Letters* 117:671-676.

- [44] Leleyter L, Probst JL, Depetris P, Haida S, Mortatti J, Rouault R, Samuel J. 1999. REE distribution pattern in river sediments: partitioning into residual and labile fractions. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii Fascicule a-Sciences De La Terre Et Des Planetes* 329:45-52.
- [45] Mongelli G. 1997. Ce-anomalies in the textural components of upper Cretaceous karst bauxites from the Apulian carbonate platform (southern Italy). *Chemical Geology* 140:69-79.
- [46] Torab-Mostaedi M. 2013. Biosorption of Lanthanum and Cerium from Aqueous Solutions Using Tangerine (*Citrus reticulata*) Peel: Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic Studies. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 19:79-88.
- [47] Kutahyali C, Sert S, Cetinkaya B, Yalcintas E, Acar MB. 2012. Biosorption of Ce(III) onto modified *Pinus brutia* leaf powder using central composite design. *Wood Science and Technology* 46:721-736.
- [48] Dubey SS, Rao BS. 2011. Removal of cerium ions from aqueous solution by hydrous ferric oxide - A radiotracer study. *Journal of Hazardous Materials* 186:1028-1032.
- [49] Du XL, Zhang TL, Li RC, Wang K. 2001. Nature of cerium(III)- and lanthanum(III)-induced aggregation of human erythrocyte membrane proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry* 84:67-75.
- [50] Murthy ZVP, Choudhary A. 2011. Separation of cerium from feed solution by nanofiltration. *Desalination* 279:428-432.
- [51] Kola H, Wilkinson KJ. 2005. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environmental Science & Technology* 39:3040-3047.
- [52] Worms IAM, Parthasarathy N, Wilkinson KJ. 2007. Ni uptake by a green alga. 1. Validation of equilibrium models for complexation effects. *Environmental Science & Technology* 41:4258-4263.
- [53] van Leeuwen HP, Town RM, Buffle J, Cleven R, Davison W, Puy J, van Riemsdijk WH, Sigg L. 2005. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environmental Science & Technology* 39:8545-8556.
- [54] Worms I, Simon DF, Hassler CS, Wilkinson KJ. 2006. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie* 88:1721-1731.
- [55] De Schamphelaere KAC, Janssen CR. 2006. Bioavailability models for predicting copper toxicity to freshwater green microalgae as a function of water chemistry. *Environmental Science & Technology* 40:4514-4522.
- [56] Brown PL, Markich SJ. 2000. Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model. *Aquatic Toxicology* 51:177-194.
- [57] Worms IAM, Wilkinson KJ. 2007. Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects. *Environmental Science & Technology* 41:4264-4270.

- [58] Francois L, Fortin C, Campbell PGC. 2007. pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: Implications for an algal BLM. *Aquatic Toxicology* 84:123-132.
- [59] Lavoie M, Fortin C, Campbell PGC. 2012. Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: The protective effect of trace zinc and cobalt concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31:1445-1452.
- [60] Slaveykova VI, Wilkinson KJ, Ceresa A, Pretsch E. 2003. Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environmental Science & Technology* 37:1114-1121.
- [61] Campbell PGC, Twiss MR, Wilkinson KJ. 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54:2543-2554.
- [62] Parent L, Twiss MR, Campbell PGC. 1996. Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella*: A test of the free-ion model of trace metal toxicity. *Environmental Science & Technology* 30:1713-1720.
- [63] Slaveykova VI, Wilkinson KJ. 2002. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science & Technology* 36:969-975.
- [64] Lamelas C, Pinheiro JP, Slaveykova VI. 2009. Effect of Humic Acid on Cd(II), Cu(II), and Pb(II) Uptake by Freshwater Algae: Kinetic and Cell Wall Speciation Considerations. *Environmental Science & Technology* 43:730-735.
- [65] Gensemer RW, Playle RC. 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 29:315-450.
- [66] Riseng CM, Gensemer RW, Kilham SS. 1991. The Effect of pH, and Chelator Manipulations on the Growth of Acidic and Circumneutral Species of *Asterionella*. *Water Air and Soil Pollution* 60:249-261.
- [67] Cremazy A, Campbell PGC, Fortin C. 2013. The Biotic Ligand Model Can Successfully Predict the Uptake of a Trivalent Ion by a Unicellular Alga Below pH 6.50 but not Above: Possible Role of Hydroxo-Species. *Environmental Science & Technology* 47:2408-2415.
- [68] Cremazy A, Levy JL, Campbell PGC, Fortin C. 2013. Uptake and subcellular partitioning of trivalent metals in a green alga: comparison between Al and Sc. *Biometals* 26:989-1001.
- [69] Pesavento M, Alberti G, Biesuz R. 2009. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. *Analytica Chimica Acta* 631:129-141.
- [70] Gupta CK, Krishnamurthy N. 1992. *Extractive Metallurgy of Rare Earths*.
- [71] Razak OA. 1998. Fluorimetric and spectrophotometric determination of ritodrine hydrochloride in bulk and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18:359-365.

- [72] Bakane MA, Joshi CP, Moharil SV, Muthal PL, Dhopte SM. 2011. Luminescence studies of decomposition of ceric sulfate. *Luminescence* 26:553-556.
- [73] Keller B, Legendziewicz J, Przybylski J, Guzik M, Glinski J. 2002. Spectroscopic studies of lanthanide (Ce, Eu) chlorides in ethane-1,2-diol. *Journal of Alloys and Compounds* 341:197-202.
- [74] Bartunek V, Smrckova O. 2010. Preparation and size control of cerium(IV) oxide ultrafine nanoparticles. *Micro & Nano Letters* 5:222-224.
- [75] Berezovskaya I, Dotsenko VP, Efryushina NP, Voloshinovskii AS, van Eijk CWE, Dorenbos P, Sidorenko A. 2005. Luminescence of Ce^{3+} ions in alkaline earth borophosphates. *Journal of Alloys and Compounds* 391:170-176.
- [76] Dorenbos P, Shalapska T, Stryganyuk G, Gektin A, Voloshinovskii A. Spectroscopy and energy level location of the trivalent lanthanides in $\text{LiYP}_4\text{O}_{12}$. *Journal of Luminescence* 131:633-639.
- [77] Vogler A, Kunkely H. 2006. Excited state properties of lanthanide complexes: Beyond ff states. *Inorganica Chimica Acta* 359:4130-4138.
- [78] Kaizu Y, Miyakawa K, Okada K, Kobayashi H, Sumitani M, Yoshihara K. 1985. Aqualigand Dissociation of $\text{Ce}(\text{OH}_2)_9^{3+}$ in the 5d-4f Excited State. *Journal of the American Chemical Society* 107:2622-2626.
- [79] Forcha D, Brown KJ, Assefa Z. 2013. Luminescence, absorption, and Stern-Volmer studies of cerium chloride and nitrate compounds in acidic and neutral aqueous, and non-aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 103:90-95.
- [80] Hazin PN, Bruno JW, Brittain HG. 1987. Luminescence Spectra of a Series of Cerium(III) Halides and Organometallics - Probes of Bonding Properties Using 4F-5D Excited-States. *Organometallics* 6:913-918.
- [81] Ryan DK, Weber JH. 1982. Fluorescence Quenching Titration for Determination of Complexing Capacities and Stability Constants of Fulvic Acid. *Analytical Chemistry* 54:986-990.
- [82] Merdy P, Bonnefoy A, Martias C, Garnier C, Huclier S. 2012. Use of fluorescence spectroscopy and voltammetry for the analysis of metal-organic matter interactions in the New Caledonia lagoon. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 92:868-893.
- [83] Bai Y, Wu F, Liu C, Guo J, Fu P, Li W, Xing B. 2008. Interaction between carbamazepine and humic substances: A fluorescence spectroscopy study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:95-102.
- [84] McIntyre AM, Gueguen C. 2013. Binding interactions of algal-derived dissolved organic matter with metal ions. *Chemosphere* 90:620-626.
- [85] Wu F, Bai Y, Mu Y, Pan B, Xing B, Lin Y. 2013. Fluorescence quenching of fulvic acids by fullerene in water. *Environmental Pollution* 172:100-107.

- [86] Chai X, Liu G, Zhao X, Hao Y, Zhao Y. 2012. Complexion between mercury and humic substances from different landfill stabilization processes and its implication for the environment. *Journal of Hazardous Materials* 209:59-66.
- [87] Sonke JE, Salters VJM. 2006. Lanthanide-humic substances complexation. I. Experimental evidence for a lanthanide contraction effect. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 70:1495-1506.
- [88] Coble PG. 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51:325-346.
- [89] Del Castillo CE, Coble PG, Morell JM, Lopez JM, Corredor JE. 1999. Analysis of the optical properties of the Orinoco River plume by absorption and fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* 66:35-51.
- [90] Maie N, Pisani O, Jaffe R. 2008. Mangrove tannins in aquatic ecosystems: Their fate and possible influence on dissolved organic carbon and nitrogen cycling. *Limnology and Oceanography* 53:160-171.
- [91] Stedmon CA, Markager S, Bro R. 2003. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* 82:239-254.
- [92] Cory RM, McKnight DM. 2005. Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* 39:8142-8149.
- [93] Holbrook RD, Yen JH, Grizzard TJ. 2006. Characterizing natural organic material from the Occoquan Watershed (Northern Virginia, US) using fluorescence spectroscopy and PARAFAC. *Science of the Total Environment* 361:249-266.
- [94] Degueldre C, Favarger PY. 2003. Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 217:137-142.
- [95] Degueldre C, Favarger PY, Rosse R, Wold S. 2006. Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta* 68:623-628.
- [96] Degueldre C, Favarger PY, Wold S. 2006. Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode. *Analytica Chimica Acta* 555:263-268.
- [97] Laborda F, Jimenez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR. 2011. Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26:1362-1371.
- [98] Laborda F, Jimenez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR. 2013. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28:1220-1232.
- [99] Hadioui M, Leclerc S, Wilkinson KJ. 2013. Multimethod quantification of Ag⁺ release from nanosilver. *Talanta* 105:15-19.

- [100] Mitrano DM, Leshner EK, Bednar A, Monserud J, Higgins CP, Ranville JF. 2012. Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31:115-121.
- [101] Hadioui M, Peyrot C, Wilkinson KJ. 2014. Improvements to Single Particle ICPMS by the Online Coupling of Ion Exchange Resins. *Analytical Chemistry* 86:4668-4674.
- [102] Versieren L, Smets E, De Schamphelaere K, Blust R, Smolders E. 2014. Mixture toxicity of copper and zinc to barley at low level effects can be described by the Biotic Ligand Model. *Plant and Soil* 381:131-142.
- [103] Liu Y, Vijver MG, Peijnenburg WJGM. 2014. Impacts of major cations (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) and protons on toxicity predictions of nickel and cadmium to lettuce (*Lactuca sativa*) using exposure models. *Ecotoxicology* 23:385-395.
- [104] Khan FR, McGeer JC. 2013. Zn-stimulated mucus secretion in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine inhibits Cd accumulation and Cd-induced lipid peroxidation. *Aquatic Toxicology* 142:17-25.
- [105] Chen Z, Zhu L, Wilkinson KJ. 2010. Validation of the Biotic Ligand Model in Metal Mixtures: Bioaccumulation of Lead and Copper. *Environmental Science & Technology* 44:3580-3586.
- [106] Röhder LA, Brandt T, Sigg L, Behra R. 2014. Influence of agglomeration of cerium oxide nanoparticles and speciation of cerium(III) on short term effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 152:121-130.
- [107] Tipping E, Lofts S, Sonke JE. 2011. Humic Ion-Binding Model VII: a revised parameterisation of cation-binding by humic substances. *Environmental Chemistry* 8:225-235.
- [108] Al-Reasi HA, Smith DS, Wood CM. 2012. Evaluating the ameliorative effect of natural dissolved organic matter (DOM) quality on copper toxicity to *Daphnia magna*: improving the BLM. *Ecotoxicology* 21:524-537.
- [109] Kozlova T, Wood CM, McGeer JC. 2009. The effect of water chemistry on the acute toxicity of nickel to the cladoceran *Daphnia pulex* and the development of a biotic ligand model. *Aquatic Toxicology* 91:221-228.
- [110] D'Angelo P, Spezia R. 2012. Hydration of Lanthanoids(III) and Actinoids(III): An Experimental/Theoretical Saga. *Chemistry-a European Journal* 18:11162-11178.
- [111] M W, D. R T. 1979. Critical Assessment of the Relationship between Biological Thermodynamic and Electrochemical Availability. *Chemical Modeling in Aqueous Systems*. Vol 93-ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp 657-680.
- [112] Kola H, Laglera LM, Parthasarathy N, Wilkinson KJ. 2004. Cadmium Adsorption by *Chlamydomonas reinhardtii* and its Interaction with the Cell Wall Proteins. *Environmental Chemistry* 1:172-179.
- [113] Hill KL, Hassett R, Kosman D, Merchant S. 1996. Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability. *Plant Physiology* 112:697-704.

- [114] Cheloni G, Cosio C, Slaveykova VI. 2014. Antagonistic and synergistic effects of light irradiation on the effects of copper on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 155:275-282.
- [115] Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Marechal-Drouard L, Marshall WF, Qu L-H, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen C-L, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernandez E, Fukuzawa H, Gonzalez-Ballester D, Gonzalez-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral J-P, Riano-Pachon DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen C-J, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martinez D, Ngau WCA, Otillar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR, Chlamydomonas A, Team JGIA. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245-251.
- [116] Gorman DS, Levine RP. 1965. Cytochrome F and Plastocyanin - Their Sequence in Photosynthetic Electron Transport Chain of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54:1665-1669.
- [117] Hassler CS, Slaveykova VI, Wilkinson KJ. 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography-Methods* 2:237-247.
- [118] Liu XW, Byrne RH. 1997. Rare earth and yttrium phosphate solubilities in aqueous solution. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 61:1625-1633.
- [119] Humphris SE. 1984. The mobility of rare earth elements in the crust. In Henderson P, ed, *Rare Earth Element Geochemistry*. Elsevier, Amsterdam, p. 317.
- [120] Motekaitis RJ, Smith RM, Martell AE. 2000. Critically selected stability constants for the determination of species concentrations and their application to separation processes. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 219:U754-U754.
- [121] Ritchie JD, Perdue EM. 2003. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 67:85-96.
- [122] 2013. Acidic Functional Groups of IHSS Samples.
- [123] Wilkinson KJ, Buffle J. 2004. Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modeling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic)

systems. In Leeuwen HPv, Koester W, eds, *Physicochemical Kinetics and Transport at Chemical - Biological Interphases*. Wiley, Chichester, pp 445-533.

[124] Yang G, Tan QG, Zhu L, Wilkinson KJ. 2014 in press. The role of complexation and competition on the biouptake of Eu by a unicellular alga. *Environmental Toxicology and Chemistry*.

[125] Campbell PGC, Stokes PM. 1985. Acidification and Toxicity of Metals to Aquatic Biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42:2034-2049.

[126] Fortin C, Denison FH, Garnier-Laplace J. 2007. Metal-phytoplankton interactions: Modeling the effect of competing ions (H^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) on uranium uptake. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:242-248.

[127] Hayes SA, Yu P, O'Keefe TJ, O'Keefe MJ, Stoffer JO. 2002. The phase stability of cerium species in aqueous systems - I. E-pH diagram for the Ce-HClO₄-H₂O system. *Journal of the Electrochemical Society* 149:C623-C630.